

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Kateřina Šimonová

Lipidové složení biologických membrán a životní strategie pěvců

Lipid composition of biological membranes and life-histories in songbirds

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

Konzultant: prof. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. června 2020

Podpis:

Poděkování:

Mé srdečné díky patří především školiteli MVDr. Oldřichu Tomáškov, Ph. D. za veškeré rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při statistickém zpracování dat a při sepisování této práce. Velmi vděčná jsem doc. Mgr. Pavlovi Munclingerovi, Ph. D. za odborné rady ohledně laboratorních prací při molekulárním určování pohlaví a jeho ochotu vše i několikrát vysvětlit. Za pomoc děkuji také dalším pracovníkům laboratoře. Velký dík patří konzultantovi prof. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph. D. a dalším kolegům a kamarádům Mgr. Ondřeji Kauzálovi, Mgr. Kryštofu Horákovi, Bc. Markovi Brindzákovi se kterými jsme tvořili skvělý tým při pracích v terénu. Dále děkuji RNDr. Ondřeji Sedláčkovi, Ph. D., doc. RNDr. Davidu Hořákovi, Ph. D. a dalším spolupracovníkům za poskytnutí dat o výskytu druhů v různých nadmořských výškách na Mt. Cameroon.

V neposlední řadě bych ráda vyjádřila dík své rodině, bez jejichž podpory by mé studium nebylo možné a kamarádům, kteří mě vždy pomohli udržet v psychické pohodě.

Práce vznikla s podporou GAČR, projekt GAČR 17-24782S: Latitudinální a altitudinální trendy v pace-of-life syndromech Afrotropických a Evropských pěvců.

ABSTRAKT

Rozdíly ve složení buněčných membrán bývají považovány za fyziologický mechanismus zodpovědný za různou intenzitu metabolismu, délku života a následně i odlišné životní strategie. Pacemakerová hypotéza předpokládá, že vyšší membránová nenasycenost může být důležitým faktorem zodpovědným za vyšší intenzitu metabolismu a kratší délku života organismů. Alternativní hypotéza naopak předpokládá, že membrány mohou fungovat jako strukturní antioxidanty, a tedy že vyšší membránová nenasycenost může být spojená s delším životem. Cílem této práce bylo otestovat, jak se mění složení mastných kyselin v membránách v závislosti na velikosti těla, zeměpisné šířce a nadmořské výšce, v rámci kterých byly pozorovány rozdílné životní strategie a intenzita metabolismu. Pro modely testující vliv zeměpisné šířky byly zvoleny temperátní a tropické nížinné druhy pěvců a pro modely testující vliv nadmořské výšky pouze tropické druhy pěvců. Součástí práce bylo molekulární určování pohlaví. Pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie bylo z krevních vzorků získáno množství jednotlivých mastných kyselin obsažených ve fosfolipidech červených krvinek.

Z výsledků bylo patrné, že složení membrán ve většině případů koreluje s velikostí těla, která též koreluje téměř se všemi znaky určujícími životní strategie. V rámci gradientu zeměpisné šířky byla nalezena vyšší nenasycenost membrán v tropických oblastech, ve kterých byly pozorovány spíše pomalé životní strategie. Ve vyšších nadmořských výškách byla zase pozorována nižší membránová nenasycenost i přesto, že zde živočichové disponují spíše vyšší intenzitou metabolismu. Výsledky této práce nepodporují pacemakerovou hypotézu, ale naopak spíše alternativní antioxidační teorii.

klíčová slova: zeměpisná šířka, nadmořská výška, mastná kyselina, membrána, metabolismus, délka života, životní strategie

ABSTRACT

Differences in the composition of cell membranes are considered to be the physiological mechanism responsible for different metabolic rates, life span and consequently, different life-histories. The membrane pacemaker theory suggests that higher membrane unsaturation may be an important factor responsible for higher metabolic rate and shorter life span of organisms. The alternative hypothesis, on the other hand, assumes that membranes can function as structural antioxidants, and thus that higher membrane unsaturation may be associated with longer life span. The aim of this work was to test how changes in the fatty acid composition of membranes depends on body size, latitude and altitude, within which different life-histories and metabolic rate were observed. Temperate and tropical lowland songbird species were chosen for the models testing the effect of latitude, and only tropical species of songbirds were chosen for the models testing the effect of altitude. Part of the work was molecular sex determination. Using gas chromatography and mass spectrometry, the amount of individual fatty acids contained in red blood cell phospholipids was obtained from blood samples.

The results showed that the composition of the membranes in most cases correlates with body size, which also correlates with almost all traits determining life-histories. Within the latitude gradient, higher membrane unsaturation was found in tropical areas where rather slow life-histories were observed. At higher altitudes, a lower membrane unsaturation was observed, even though the animals here have a rather higher metabolic rate. The results of this work do not support the membrane pacemaker theory, but rather an alternative antioxidant theory.

Keywords: latitude, altitude, fatty acid, membrane, metabolism, life span, life-histories

SEZNAM ZKRATEK

POLS – *pace-of-life syndrom* (syndromy životního tempa)

BMR – *basal metabolic rate* (bazální metabolický výdej)

RMR – *resting metabolic rate* (klidový metabolický výdej)

FMR – *field metabolic rate*

PMR – *peak metabolic rate*

TDEE – *total daily energy expenditure* (celkový denní výdej energie)

ROS – *reactive oxygen species* (reaktivní formy kyslíku)

MK – mastná kyselina

UFA – *unsaturated fatty acid* (nenasycená mastná kyselina)

PUFA – *polyunsaturated fatty acid* (polynenasycená mastná kyselina)

MUFA - *monounsaturated fatty acid* (mononenasycená mastná kyselina)

SFA - *saturated fatty acid* (nasycená mastná kyselina)

DBI – *double bond index* (index průměrného počtu dvojných vazeb)

PI – *peroxidation index* (peroxidační index)

ACL – *average chain length* (průměrná délka řetězce)

MPTA – *Membrane pacemaker theory of aging* (pacemakerová teorie stárnutí)

DHA – *docosahexaenoic acid* (kyselina dokosahexaenová)

n3 PUFA – *omega 3 polyunsaturated fatty acid* (omega 3 nenasycená mastná kyselina)

n6 PUFA – *omega 6 polyunsaturated fatty acid* (omega 6 nenasycená mastná kyselina)

DNA – *deoxyribonucleic acid* (deoxyribonukleová kyselina)

CHD1 - *chromo-helicase-DNA-binding protein 1*

PCR – *polymerase chain reaction* (polymerázová řetězová reakce)

ATP5A1 – *ATP synthase subunit alpha*

6-FAM – *6-carboxyfluorescein*

FAME - *fatty acids methyl ester* (estery mastných kyselin)

GC – *gass chromatography* (plynová chromatografie)

MS – *mass spektrometry* (hmotnostní spektrometrie)

ESS – *effective sample size* (efektivní velikost vzorku)

CI – *confidential interval* (interval kredibility)

MCMC – *Markov chain Monte Carlo*

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	ŽIVOTNÍ STRATEGIE A SYNDROMY ŽIVOTNÍHO TEMPÁ	2
3.	VLIV ZEMĚPISNÉ ŠÍŘKY NA ŽIVOTNÍ STRATEGIE PTÁKŮ	5
4.	VLIV NADMOŘSKÉ VÝŠKY NA ŽIVOTNÍ STRATEGIE PTÁKŮ	7
5.	BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY A ŽIVOTNÍ STRATEGIE	8
5.1	Pacemakerová hypotéza.....	11
5.2	Hypotéza membrán jako strukturních antioxidantů	14
5.3	Další vlastnosti mastných kyselin a jejich vliv na životní strategie	14
6.	PREDIKCE A CÍL PRÁCE	16
7.	MATERIÁL A METODIKA	17
7.1	Zkoumané druhy ptáků, odchyty a odběr vzorků	17
7.2	Genetické určení pohlaví	19
7.3	Sběr ekologických dat	20
7.4	Analýza mastných kyselin	21
7.5	Statistická analýza	23
8.	VÝSLEDKY	25
8.1	Opakovatelnost měření membránových indexů	25
8.2	Mezidruhová variabilita a vliv fylogeneze	25
8.3	Vliv zeměpisné šířky na nenasycenost MK	26
8.4	Vliv zeměpisné šířky na poměr n6/n3 PUFA.....	28
8.5	Vliv zeměpisné šířky na délku řetězce MK.....	30
8.6	Vliv nadmořské výšky na nenasycenost MK	32

8.7	Vliv nadmořské výšky na poměr n_6/n_3 PUFA	36
8.8	Vliv nadmořské výšky na délku řetězce MK.....	38
9.	DISKUZE.....	40
10.	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ	45
11.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
12.	PŘÍLOHY	58

1. ÚVOD

Složení biologických membrán bývá považováno za jeden z faktorů, který může být zodpovědný za různé životní strategie živočichů, skrze fyziologické mechanismy, jako je intenzita metabolismu či odolnost vůči poškození. Právě obsah různých membránových mastných kyselin může být pro tyto fyziologické mechanismy důležitý. Podle pacemakerové hypotézy disponují organismy mající více polynenasycené membrány (vyšší obsah dvojných vazeb) fluidnějšími membránami a s tím souvisejícím rychlejším metabolismem a vyšší náchylností k oxidačnímu poškození. Takovéto fyziologické nastavení je následně zodpovědné za kratší délku života a formování rychlejších životních strategií (Ricklefs and Wikelski, 2002; Hulbert, 2005; Hulbert et al., 2007). Na základě výsledků rozporujících tuto hypotézu vznikly úvahy, že polynenasycené membrány mohou fungovat i jako strukturní antioxidanty (Schmid-Siegert et al., 2016) či že metabolizace polynenasycených MK, oproti nasyceným MK, může být pomalejší a ne příliš energeticky výhodná (Bozek et al., 2017). Podle těchto hypotéz by naopak více nenasycené membrány mohly souviset s vyšší odolností organismu a vyšší délkou života. Uvažuje se dokonce, že pro živočichy může být důležitější poměr $n6/n3$ PUFA (Valencak and Ruf, 2007; Valencak and Azzu, 2014) a délka řetězců MK (Galván et al., 2015), než celková membránová nenasycenost. Vyšší poměr $n6/n3$ PUFA a kratší délku řetězců MK bychom pak měli pozorovat u živočichů s kratší délkou života.

Dosavadní studie většinou testovaly vztah mezi složením membrán a délkou života. Tyto studie jsou však velmi různorodé, ať už z hlediska testovaného počtu různých druhů živočichů a typů vzorků (celkové či mitochondriální lipidy jater, srdce, svaloviny, červených krvinek, plazmatické volné MK), ale také z hlediska výsledků.

Uvedené hypotézy budu v této práci testovat za pomoci dvou modelových systémů na fosfolipidech červených krvinek. První z nich je model zahrnující nížinné temperátní a tropické druhy pěvců, založený na pozorovaném rozdílném metabolickém výdeji a životních strategiích v těchto oblastech. Temperátní druhy disponují rychlejšími životními strategiemi s rychlejším metabolismem, zatímco tropické druhy tíhnou spíše k těm pomalejším.

Druhý model srovnává tropické druhy pěvců v rámci různých nadmořských výšek a je založen především na znalostech o metabolickém výdeji, který je ve vyšších polohách větší.

2. ŽIVOTNÍ STRATEGIE A SYNDROMY ŽIVOTNÍHO TEMPA

Z evolučního hlediska je strategií všech živých organismů přenos co největšího množství svých genů do dalších generací, takzvaná maximalizace fitness. Nejdůležitějšími faktory determinujícími fitness jsou rozmnožování a míra přežívání. Nejúspěšnější jsou tedy jedinci, kteří mají nejvíce potomků schopných dožít se období rozmnožování. Toho dosáhnou pouze ti nejlépe přizpůsobení daným podmínkám prostředí, ve kterých se nachází. Dle toho se postupem času ustavily různě výhodné životní strategie (Darwin, 1869; Haldane, 1932; Brandon, 1990).

Životní strategie jsou definovány různými životními charakteristikami, o kterých mluvíme jako o life-history znacích, mezi kterými existuje trade-off (kompromis). Nejdůležitější takové znaky jsou např. rychlost rozmnožování, délka života, mortalita dospělců a mláďat, rychlost růstu, věk a tělesná velikost v pohlavní dospělosti (Stearns, 1989, 1992). Protože kvůli různým omezením (fyziologickým či ekologickým) nelze maximalizovat všechny tyto znaky, pohybují se výsledné životní strategie v ose mezi rychlým a pomalým životním tempem, tzv. fast-slow life-history continuum (Stearns, 1983; Sæther, 1988; Read and Harvey, 1989; Stearns, 1992).

Nejvýznamnějším trade-off, které ovlivňuje evoluci životních strategií na tomto kontinuu je trade-off mezi investicí do reprodukce a do mechanismů zajišťujících přežívání a dlouhověkost. Jinak řečeno mezi investicí do reprodukce současné a budoucí. Pozice druhu na fast-slow kontinuu je dle současných poznatků dána zejména mírou vnější mortality, kterou definuje hlavně míra predace mláďat či dospělců, choroby a podmínky prostředí. (Williams, 1957, 1966; Cody, 1966; Read and Harvey, 1989; Ghalambor and Martin, 2001; Réale et al., 2010; Valcu et al., 2014; Stark et al., 2020). Druhy s vysokou vnější mortalitou dospělců mají menší pravděpodobnost přežití do dalšího rozmnožování. Pro takové druhy nemá příliš význam investovat do opravných mechanismů organismu a vyplatí se více investovat do aktuální reprodukce. Takovéto druhy se nachází na rychlém konci life-history continua. Oproti tomu se životní strategie pomalého životního tempa bude uplatňovat spíše u druhů s nízkou vnější mortalitou dospělců, pro které je výhodné pomalejší rozmnožování a vyšší investice do údržby

organismu umožňující delší dobu dožití. Rychlost růstu populace takovýchto druhů je nízká, ale populace poměrně stabilní (MacArthur and Wilson, 1967; Pianka, 1970; Read and Harvey, 1989; Stearns, 1989; Ricklefs, 2000).

Životní strategie jsou do velké míry determinovány velikostí těla, která je velmi úzce spjata s mírou predace, jelikož větší druhy mohou být uloveny pouze omezeným počtem predátorů (Valcu et al., 2014). Na základě předpokladu, že podobné životní strategie by měly selektovat podobné fyziologické a behaviorální adaptace, byl koncept životních strategií o tyto adaptace postupně rozšířen (Ricklefs and Wikelski, 2002; Réale et al., 2010). Soubory life-history znaků a adaptací asociovaných s určitou životní strategií byly nazvány syndromy životního tempa (**pace of life syndromy; POLS**) a opět tvoří kontinuum od rychlých po pomalé. Syndromy životního tempa byly popsány nejenom na úrovni druhů, ale také na úrovni populací v rámci jednoho druhu a dokonce i na úrovni jedinců v rámci jedné populace (Réale et al., 2010).

Velikost těla není důležitá jen pro míru predace, ale je zásadním faktorem i pro metabolický výdej, který je velmi důležitou POLS adaptací. Celkový metabolický výdej je množství energie vydané organismem za jednotku času a je výsledkem veškerých energetických reakcí organismu (Ricklefs and Wikelski, 2002; Brown et al., 2004; Speakman, 2005). Toto množství energie se s velikostí těla zvyšuje. Pro charakteristiku životních strategií se proto také používá hmotnostně specifický metabolický výdej, který je definován jako klidový výdej energie na jednotku tělesné hmotnosti. Hmotnostně specifický metabolický výdej vykazuje korelaci s velikostí těla přesně opačnou nežli celkový metabolický výdej, tedy s velikostí těla klesá (Symonds, 1999; White and Kearney, 2012). Důvodem této negativní korelace hmotnostně specifického metabolického výdeje s velikostí těla je pravděpodobně nižší schopnost vyzařování přebytečného tepla u velkých druhů, jelikož poměr povrchu těla k jeho objemu se s narůstající velikostí těla snižuje (Hulbert, 2014). Metabolický výdej definujeme různě. Pravděpodobně nejčastěji je studován bazální metabolický výdej (BMR; *basal metabolic rate*), což je množství energie vydané za jednotku času, nezbytné pro bazální funkce organismu v naprostém klidovém stavu a bez nutnosti trávení (nalačno) a termoregulace (Hulbert and Else, 1999; Ricklefs and Wikelski, 2002). Méně striktní pravidla platí pro měření klidového metabolického výdeje (RMR; *resting metabolic rate*), kdy jsou podmínky velmi podobné jako pro měření BMR, ale zahrnuje i

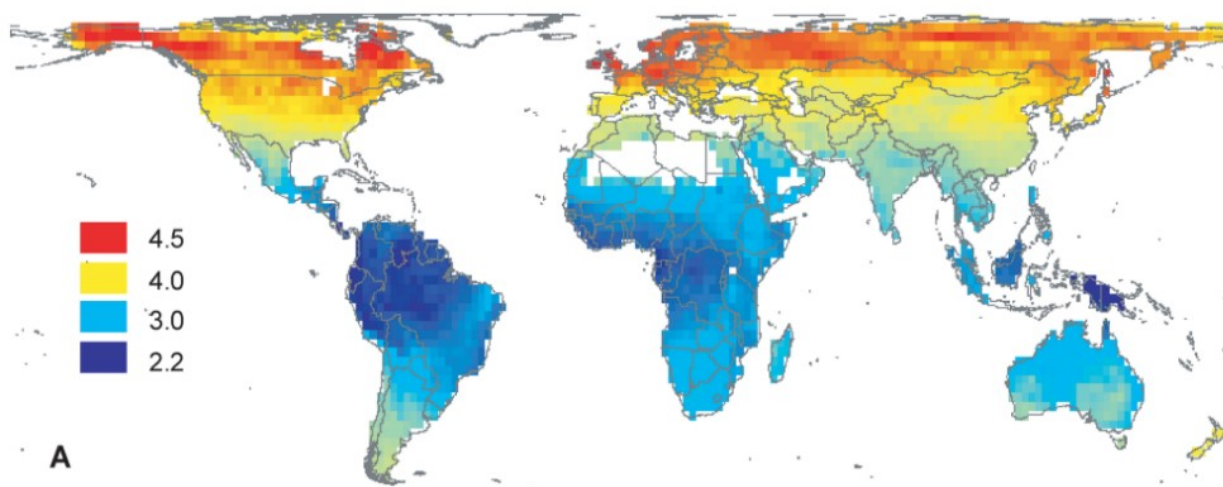
všechny běžné denní pohyby. Někdy je měřen také jako celkový denní výdej energie (TDEE; *total daily energy expenditure*) (Speakman, 2005). Velmi podobným je i FMR (*field metabolic rate*) neboli intenzita metabolismu naměřená při běžné aktivitě u volně žijících živočichů (Butler et al., 2004). Některé studie používají též PMR (*peak metabolic rate*), což je indukovaná maximální intenzita metabolismu (Wiersma et al., 2007a).

S velikostí těla pozitivně koreluje i délka života živočichů (Symonds, 1999; Speakman, 2005). Byla navržena hypotéza, že by za tuto souvislost mohla být zodpovědná intenzita metabolismu. Předpokladem bylo, že větší organismy žijí déle, než ty menší a vysvětlit by to měl právě pomalejší hmotnostně specifický metabolismus, kterým větší organismy disponují (*Rate-of-living theory*) (Rubner, 1908; Pearl, 1928). Některé studie savčích druhů nachází negativní korelaci mezi intenzitou metabolismu a délkou života (Symonds, 1999; Duarte and Speakman, 2014; Healy et al., 2014), jiné nachází korelaci pozitivní (Speakman et al., 2004). Mezidruhové studie ptáků a savců porovnávající intenzitu metabolismu (RMR, či TDEE) ukazují, že ptáci mají při stejné velikosti jako savci rychlejší metabolismus, často spojený i s vyšší délkou života (White and Seymour, 2004; Speakman, 2005; Munshi-South and Wilkinson, 2010). Pokud jsou data kontrolována na vliv hmotnosti a fylogeneze, intenzita metabolismu s délkou života nekoreluje a to jak u ptáků a savců (Read and Harvey, 1989; de Magalhães et al., 2007), tak u ektotermních a endotermních čtyřnožců (Stark et al., 2020). Pozorovaný negativní vztah mezi hmotnostně specifickým metabolickým výdejem a délkou života je tedy nejspíše způsoben korelací obou těchto proměnných s velikostí těla (Speakman et al., 2004; Speakman, 2005; de Magalhães et al., 2007; Furness and Speakman, 2008). Studie zaměřené na vztah intenzity metabolismu s jinými life-history znaky, kontrolované na vliv velikosti těla, přináší převážně smíšené výsledky a nesignifikantní korelace (Read and Harvey, 1989; Harvey et al., 1991; Symonds, 1999; White and Seymour, 2004). Pozorování, že větší snůšky vyžadují vyšší energetický výdej (Heij et al., 2007), odpovídá nalezená pozitivní korelace intenzity metabolismu a počtu mláďat v jednom vrhu pro některé skupiny savců (Read and Harvey, 1989; Harvey et al., 1991; White and Seymour, 2004). Tato korelace byla ale pro některé savčí druhy nalezena i negativní (White and Seymour, 2004). Na vnitrodruhové úrovni byla také pozorována vyšší délka dožití a vyšší hmotnostně specifická intenzita metabolismu u rozmnožujících se jedinců. Tento

výsledek tedy ukazuje, že rozmnožování nemusí nutně znamenat snížení délky života (Schielke et al., 2017).

3. VLIV ZEMĚPISNÉ ŠÍŘKY NA ŽIVOTNÍ STRATEGIE PTÁKŮ

Jedním z hlavních latitudinálních trendů pozorovatelných u ptáků ve vztahu k životním strategiím je pozitivní korelace velikosti snůšky s latitudou. Tento vztah byl pozorován např. u stredo- a severo-amerických druhů ptáků (Skutch, 1940), ale také při porovnání afrických a evropských druhů (Moreau, 1944). Typická snůška tropických druhů obsahuje 1–2 vejce, zatímco u temperátních druhů je to 4–6 vajec, viz Obr. 1 (Jetz et al. 2008). Proč tomu tak je není snadné vysvětlit. Historie teorií na toto téma je dlouhá a faktorů může být vícero.



Obr. 1. Mapa variability velikosti snůšky napříč druhy a různými latitudami (Jetz et al., 2008).

Stabilní je v tropech především teplota, která je zde v hnízdící době vyšší než v temperátech (Stoleson and Beissinger, 2002). Dalšími faktory mohou být nižší dostupnost potravy (Reid et al., 2000; Stoleson and Beissinger, 2002; Cooper et al., 2005) a kratší délka dne v době rozmnožování (Lack, 1947; Ashmole, 1963; Sanz, 1999; Martin et al., 2000; Dunn et al., 2009), které v tropech nacházíme. Významnou roli by mohl mít trade-off mezi intenzitou rozmnožování a mírou přežívání mláďat (Lack, 1947), tedy míra vnější mortality mláďat, která je v tropických oblastech vyšší. Důvodem této korelace může být vyšší míra predace v tropech (Skutch, 1949; Ghalambor and Martin, 2001; Dillon and Conway, 2018), kterou ale ne všechny

studie nachází (Martin et al., 2000). Dalším life-history znakem, u kterého můžeme sledovat latitudinální rozdíly je míra přežívání jedinců do další sezóny, na jejímž základě se odhaduje i celková délka života (Mcgregor et al., 2007; Muñoz et al., 2018; Scholer et al., 2018). Ptáci ve vyšších latitudách mají nižší pravděpodobnost přežití do další sezóny (Johnston et al., 1998; Ghalambor and Martin, 2001; Mcgregor et al., 2007; Martin et al., 2017; Muñoz et al., 2018; Boyce et al., 2020). Vyšší pravděpodobnost přežívání dospělců v tropech může být důvodem i k vyššímu ročnímu počtu snůšek (Skutch, 1985; Martin, 1996; Bohning-Gaese et al., 2000; Scholer et al., 2018).

Všechny tyto poznatky nás vedou k předpokladu, že tropičtí ptáci mají oproti temperátním druhům pomalé životní strategie a s nimi související pomalé POLS, viz Tabulka 1 (Wikelski et al., 2003; Wiersma et al., 2007b). Z hlediska fyziologických adaptací, jako je intenzita metabolismu, se dle novodobých studií tyto předpoklady zdají být správné. Weathers (1979) vysledoval inverzní vztah mezi intenzitou metabolismu a teplotou habitatu a pozitivní vztah mezi intenzitou metabolismu a latitudou, kdy druhy z chladnějších vyšších latitud vykazovaly vyšší intenzitu metabolismu, která je důležitá k udržení tělesné teploty, zatímco ty z teplejších tropických habitatů nižší. Mezidruhové studie ptáků nižší intenzitu metabolismu (BMR i maximální metabolický výdej) v tropech také podporují (Wiersma et al., 2007b, 2007a; McNab et al., 2013; Londoño et al., 2015; Bushuev et al., 2018; Bech et al., 2016; Boyce et al., 2020). Nižší intenzita metabolismu v tropech byla dokumentována i na vnitrodruhové úrovni u bramborníčka afrického (*Saxicola torquatus*) (Wikelski et al., 2003) a střízlíka zahradního (*Troglodytes aedon*) (Tieleman et al., 2006). Stejná korelace byla nalezena i na tkáňové úrovni ptačích dermálních fibroblastů (Jimenez et al., 2014). Je také uvažován rozdíl mezi velikostí tkání a orgánů v různých latitudách a s tím spojená různá intenzita metabolismu. Tropické druhy mají orgány menší, tedy i s nižším metabolickým výdejem (Wiersma et al., 2012; Jimenez and Williams, 2014).

LATITUDA	temperát	tropy
POLS	rychlé	pomalé
Intenzita metabolismu	vyšší	nižší
Velikost snůšky	4 - 6	2
Mortalita dospělců	~ 50%	~ 40%
Mortalita mláďat	~ 50%	~ 70%

Tabulka 1. Rozdíly v life-history znacích u ptáků temperátů a tropů (Johnston et al., 1998; Stutchbury and Morton, 2001; Peach et al., 2001).

4. VLIV NADMOŘSKÉ VÝŠKY NA ŽIVOTNÍ STRATEGIE PTÁKŮ

Se stoupající nadmořskou výškou můžeme pozorovat změny ekologických podmínek jako menší stabilita prostředí, nižší obsah kyslíku ve vzduchu, nižší atmosférický tlak, silnější UV záření, snižující se průměrná teplota a také její vyšší variabilitu. Předpokládáme, že tyto změny v rámci elevace mohou být důležité pro evoluci životních strategií. S nižší teplotou a menší stabilitou prostředí se zvyšují energetické nároky jedinců na termoregulaci, a proto je pro udržení tělesné teploty nezbytný rychlejší metabolismus (Cody, 1966; Scott, 2011; Hille and Cooper, 2015; Balasubramaniam and Rotenberry, 2016; Boyle et al., 2016). Vyšší intenzitu metabolismu ve vyšších elevacích dokládají vnitrodruhové studie savců (Hayes, 1989; Storz et al., 2019) i subtropických ptáků Kalifornie (Weathers et al., 2002) a Jihoafrické republiky (Soobramoney et al., 2003; Lindsay et al., 2009). Existuje však i minimálně jedna studie z neotropů, ve které na elevačním gradientu variabilita v BMR pozorována nebyla (Londoño et al., 2015). V závislosti na ekologických podmínkách nacházíme ve vyšších polohách rozdíly v dalších life-history znacích jako je nižší počet snůšek (Badyaev, 1997; Badyaev and Ghalambor, 2001; Bears et al., 2009; Martin et al., 2009; Tieleman, 2009; Ogdens et al., 2012; Hille and Cooper, 2015; Boyle et al., 2016) a kvůli nižší teplotě se zvyšuje i doba potřebná pro inkubaci vajec (Badyaev, 1997; Badyaev and Ghalambor, 2001; Lu et al., 2010) i samotná velikost vajec (Sandercock et al., 2005; Lu et al., 2010; Wilson and Martin, 2011; Balasubramaniam and Rotenberry, 2016). Na základě teploty a intenzity metabolismu předpokládáme, že bychom mohli ve vyšších nadmořských výškách pozorovat podobný trend jako u vyšší latitudy, a tím jsou rychlejší životní strategie.

Life-history znaky jako jsou velikost snůšky a míra přežívání ale naznačují, že by živočichové ve vyšších polohách mohli mít spíše pomalejší životní strategie. Studie velikosti

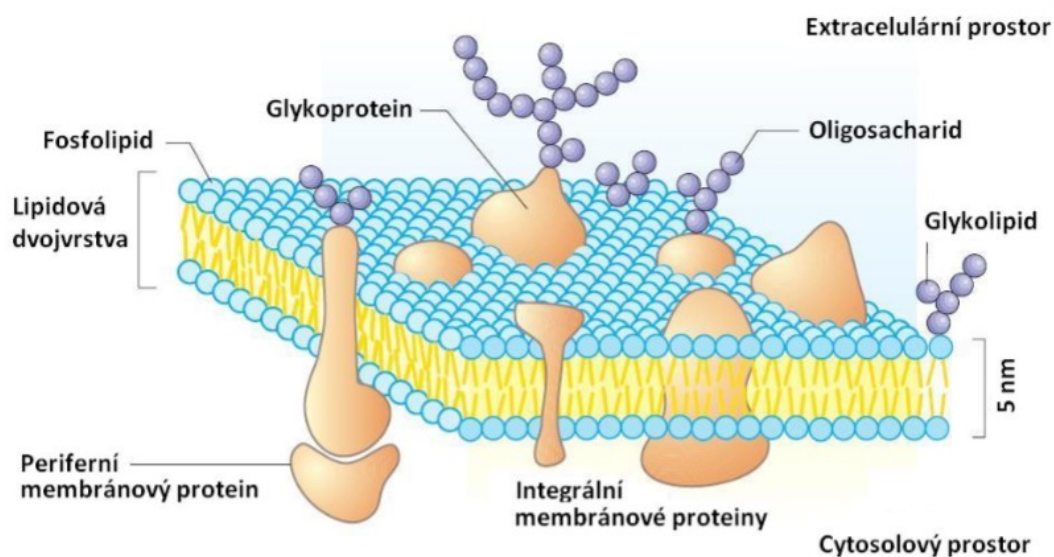
snůšek ukazují, až na pár výjimek, konzistentní výsledky menších snůšek ve vyšších nadmořských výškách (Hille and Cooper, 2015; Boyle et al., 2016; Badyaev, 1997; Boyce et al., 2015; Sanz, 1998; Bears et al., 2009; Lu et al., 2010; Dillon and Conway, 2015). Výjimkou je studie nacházející větší snůšky ve vyšších polohách pro ptáky z tropických oblastí. Tato opačná korelace by mohla souviset se studiem ptáků patřících do řádu hrabavých (*Galliformes*), zatímco předchozí práce se věnovaly převážně pěvcům (*Passeriformes*) (Balasubramaniam and Rotenberry, 2016). Nacházíme ale i studie, které korelaci elevace a velikosti snůšky nenašly žádnou (Tieleman, 2009; Ogdens et al., 2012). Práce zaměřující se na míru přežívání dospělců uvádí vyšší míru přežívání ve vyšších nadmořských výškách (Martin et al., 2009; Sandercock et al., 2005; Wilson and Martin, 2011) nebo také pozitivní korelaci pouze pro samčí jedince (Tieleman, 2009) a některé studie nenachází žádnou korelaci (Badyaev and Ghalambor, 2001).

Vzhledem k faktu, že většina studií pochází z mírného pásu, není jasné, zda je možné jejich výsledky generalizovat i na tropické oblasti – viz například pozorované odlišnosti ve vlivu nadmořské výšky na velikost snůšky u tropických a temperátních hrabavých (Balasubramaniam and Rotenberry 2016). Závěrem lze říci, že v elevačním gradientu není, na základě dostupných poznatků o life-history znacích, možné jasně predikovat pomalé a rychlé životní strategie.

5. BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY A ŽIVOTNÍ STRATEGIE

Biologické membrány hrají stěžejní roli ve fungování organismů. Jejich funkcí je polopropustně oddělit dvě různá prostředí. Vymezují jak samotné buňky, tak i jejich orgány a jejich funkčně odlišná vnitřní prostředí a ovlivňují vstup různých molekul do buněk, či orgánů. Kromě toho zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, napomáhají nervovým přenosům a mají další transportní a signální funkce. Membrány jsou tvořeny různými typy lipidů, zejména fosfolipidy. Struktura membrány je udržována právě díky fosfolipidové dvojvrstvě, která se skládá převážně z glycerofosfolipidů. Tato struktura je možná díky vlastnosti, kterou fosfolipidy disponují, a tím je jejich amfipatičnost – molekula fosfolipidu obsahuje jak hydrofilní část (kyselina fosforečná), tak hydrofóbní část (mastné kyseliny). Díky tomu je molekula na straně jedné od vodného prostředí odpuzována a na straně druhé přitahována, což ve vodném

prostředí vede k tvorbě dvojvrstvy s hydrofóbními částmi orientovanými k sobě, viz Obr. 2 (Koolman and Roehm, 2005; Yeagle, 2016).



Obr. 2 Struktura membrány (převzato a upraveno z Koolman and Roehm, 2005)

Právě obsah mastných kyselin (MK) v membránových lipidech je určující pro vlastnosti a funkčnost membrán. Membránové MK se liší svou délkou (u obratlovců nejčastěji 16–22 uhlíkových atomů, v průměru 18C; Hulbert et al., 2006b; Pamplona, 2008; Galván et al., 2015) a obsahem jednoduchých a dvojných vazeb v řetězci. Nasycené MK (*saturated fatty acids*; SFA) neobsahují žádnou dvojnou vazbu, kdežto nenasycené MK (*unsaturated fatty acids*; UFA) alespoň jednu. Podle počtu dvojných vazeb dále rozlišujeme mononenasycené MK (*monounsaturated fatty acids*; MUFA) obsahující pouze jednu dvojnou vazbu a polynenasycené MK (*polyunsaturated fatty acids*; PUFA) obsahující dvě a více dvojných vazeb (Hulbert and Else, 1999; Yeagle, 2016).

Dalšími nezbytnými komponenty membrán jsou proteiny, které jsou zastoupeny ve velkém množství a s lipidy přímo interagují. Předpokládá se, že se zvyšující se aktivitou membránových proteinů se zvyšuje i metabolická aktivita (Hulbert and Else, 1999). Vypozorován byl vztah mezi délkou řetězce MK a aktivitou transmembránových proteinů, kdy se s rostoucí délkou řetězce lipidových MK snižuje aktivita těchto proteinů, což má vliv i na aktivitu celých orgánů (Lee, 2004). Právě složení biologických membránby mohlo být hlavním faktorem

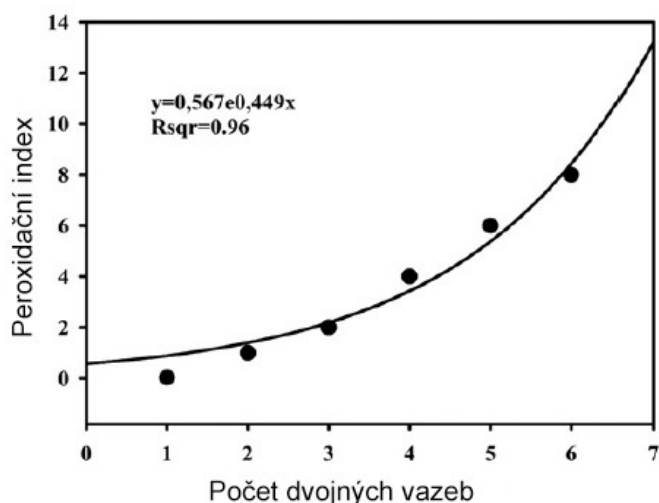
zodpovědným za různou délku života a intenzitu metabolismu, a tím i různé životní strategie (Hulbert and Else, 1999).

Zastoupení různých typů MK v membránách určuje i jejich fluiditu, tedy schopnost molekul volně se pohybovat v rámci jedné lipidové vrstvy (princip fluidní mozaiky). Fluidnější membrána umožňuje organismu rychlejší transmembránový přenos molekul, který vyžaduje i vyšší výdej energie, což by mohlo vést i k intenzivnějšímu metabolismu (Couture and Hulbert, 1995; Porter et al., 1996). Na fluiditu má největší vliv stupeň nenasycenosti MK a jejich délka (Singer and Nicolson, 1972; Hulbert and Else, 1999). Membrána se stává více fluidní se stoupající nenasyceností. Největší vliv na zvýšení fluidity má přidání první dvojné vazby (tedy MUFA vs. SFA), kdežto další dvojné vazby (tedy PUFA vs. MUFA) již fluiditu zvyšují méně (Couture and Hulbert, 1995; Pamplona, 2008).

Vedlejším produktem energetického metabolismu jsou volné kyslíkové radikály a jiné reaktivní formy kyslíku (ROS), které fungují jako silné oxidanty. Největším takovým producentem ROS jsou mitochondrie, kde vznikají jako vedlejší produkty aerobního energetického metabolismu, konkrétně v procesu oxidativní fosforylace, který probíhá v mitochondriálním dýchacím řetězci. V závěrečných fázích mitochondriálního dýchacího řetězce vzniká kvůli neúplné oxidaci kyslíku superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$), který v těle vyvolává vznik dalších vysoce reaktivních ROS, jako např. hydroxylového radikálu ($\text{HO}\bullet$) nebo peroxidu vodíku (H_2O_2). Tyto ROS mají delší biologický poločas a mohou se tedy šířit dále do organismu, kde mohou působit nevratná oxidační poškození buněk. Kumulace oxidačního poškození může mít za následek zhoršenou funkčnost tkání a následně i celého organismu (Harman, 1956; Sohal and Weindruch, 1996). ROS však v organismu nejsou produkovány pouze jako škodlivé molekuly, ale i cíleně jako molekuly se signalizačními funkcemi pro udržení tělní homeostázy. Homeostáza organismu je nezbytná, proto se tělo snaží vytvářet i opravné molekuly zvané antioxidanty bránící jeho poškození. Antioxidanty se tradičně dělí na enzymatické, jako jsou například superoxid dismutáza (SOD) a kataláza (CAT), či neenzymatické, mezi něž patří například glutathion, vitamíny C, D a E, koenzym Q (ubichinon) a jiné. Funkcí antioxidantů je neutralizovat účinky oxidantů a minimalizovat tak poškození organismu (Fridovich, 1978; Finkel, 1998; Barja, 2004; A. Hulbert, 2005; Hulbert et al., 2007). Stav vychýlení rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty

směrem k oxidantům nazýváme oxidační stres a je považován za jeden z mechanismů stárnutí organismu (*Oxidative-stress theory of aging*) (Harman, 1956; Miquel et al., 1980; Sohal and Weindruch, 1996; Hulbert et al., 2007).

Velmi důležitou roli v oxidačním stresu hraje obsah nenasycených MK v membránách. ROS primárně napadají lipidy obsahující MK s dvojnými vazbami, jež mají velmi reaktivní vodíkové atomy a tím iniciují řetězovou reakci lipidové peroxidace (Holman, 1954; Fridovich, 1978; Finkel, 1998; Hulbert, 2005; Ayala et al., 2014). Bylo prokázáno, že čím více je membrána polynenasycená (tzn. čím více dvojných vazeb obsahuje), tím náchylnější je k peroxidaci, viz Obr. 3. Pokud známe procentuální zastopení jednotlivých MK v membráně, můžeme spočítat index udávající průměrný počet dvojných vazeb na MK (double bond index; DBI) a index indikující citlivost membrány k peroxidaci (peroxidační index; PI) (Bielski et al., 1983; Hulbert et al., 2007; Pamplona, 2008; Ayala et al., 2014).

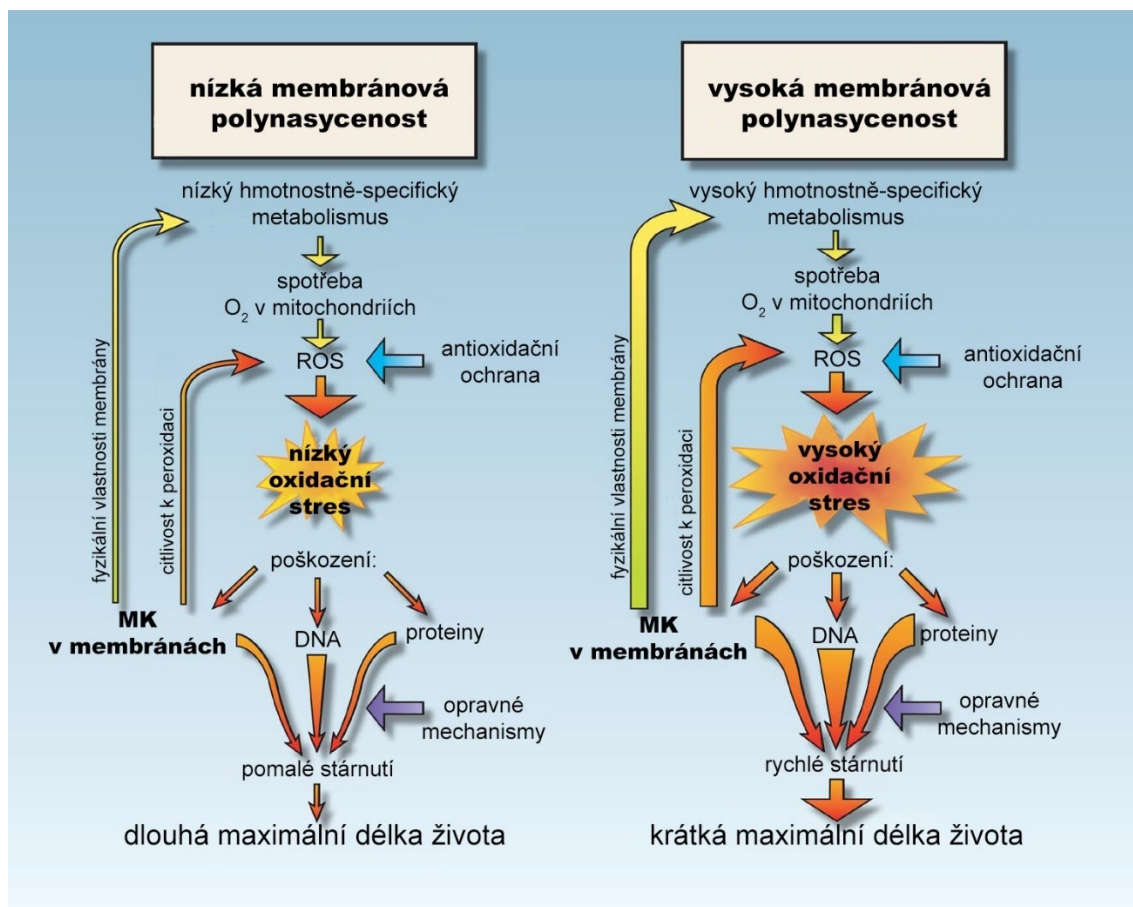


Obr. 3. Pozitivní korelace mezi peroxidačním indexem (citlivost membrány k peroxidaci) a počtem dvojných vazeb u nenasycených MK (Pamplona, 2008).

5.1 Pacemakerová hypotéza

Pacemakerová teorie stárnutí (Membrane pacemaker theory of aging, **MPTA**; (Hulbert, 2005) shrnuje předešlé poznatky o složení membrán, metabolismu, délce života, stárnutí a peroxidaci lipidů (Pearl, 1928; Harman, 1956; Miquel et al., 1980; Sohal and Weindruch, 1996) a na jejich základě předpokládá, že míra nenasycenosti MK v buněčných membránách determinuje jejich

fluiditu a citlivost k peroxidaci a následně rychlost metabolismu a stárnutí organismu. Dle MPTA mají organismy s více polynenasycenými buněčnými membránami rychlejší metabolismus a tudíž vyšší produkci ROS. Navíc jsou tyto membrány i méně odolné k oxidačnímu poškození. Kombinace těchto dvou faktorů by podle MPTA měla mít za následek vyšší míru oxidačního stresu v organismu, a tím jeho rychlejší stárnutí a kratší délku života. Naproti tomu nižší zastoupení nenasycených MK v membránách by měla mít za následek pomalejší metabolismus, tím i nižší produkci ROS. Membrány s nižším stupněm nenasycenosti jsou zároveň odolnější k peroxidaci a tato kombinace může poskytovat výhodu snížené intenzity oxidačního poškození organismu a tudíž delšího života; viz Obr. 4 (Hulbert, 2005).



Obr. 4. Schéma pacemakerové teorie stárnutí (převzato a upraveno z Hulbert et al., 2007)

Tuto teorii podporují studie různých tkání, zabývající se vztahem mezi DBI či PI a délkou života, ve kterých množství dvojných vazeb negativně koreluje s maximální délkou života.

V těchto studiích však bylo většinou porovnáváno několik málo druhů savců (relativně krátkověcí) a ptáků (relativně dlouhověcí), přičemž výjimkou nejsou ani studie založené na párovém srovnání jednoho savčího a jednoho ptačího druhu. V těchto případech jsou výsledky shodné s MPTA, tedy že některé tkáně, mitochondrie, či plazmatické MK dlouhověkých druhů obsahují méně polynenasycených MK a díky tomu jsou odolnější k peroxidaci (Pamplona et al., 1996, 1999a, 2000, 2002; Gutiérrez et al., 2000, 2006; Hulbert et al., 2007; Montgomery et al., 2011; Jové et al., 2013). Rozsáhlejší korelační studie však MPTA většinou nepodporují. Valencak and Ruf (2007) sledovali složení membrán tkáňových fosfolipidů u 42 druhů savců a korelaci délky života s obsahem tkáňových PUFA (DBI) po odfiltrování vlivů fylogeneze a hmotnosti nepozorovali.

K opačným závěrům, nežli předpokládá MPTA, došel Galván et al. (2015) ve své studii obsahu lipidů v jaterní tkáni 107 druhů ptáků, ve které byla pozorována pozitivní korelace PI a délky života. Stejně tak ve vnitrodruhové studii myší byl zjištěn vyšší celkový obsah tkáňových PUFA u déle žijících jedinců (Valencak and Ruf, 2013). Některá empirická pozorování ukazují, že dlouhověké druhy mají sice snížený obsah PUFA, ale naopak vyšší obsah MUFA (Pamplona et al., 1999b; Hulbert et al., 2006b, 2006a; Pamplona, 2008; Valencak and Ruf, 2013; Galván et al., 2015; Schroeder and Brunet, 2015). Dle studie Bozek et al. (2017) může nižší obsah PUFA a vyšší obsah MUFA způsobovat vyšší odolnost membrán proti peroxidaci díky nižšímu celkovému obsahu dvojných vazeb, a proto mohou živočichové disponovat vyšší délkou života.

Nejistá je také podpora pro korelace složení membrán a rychlost metabolismu, kdy teorie predikuje vyšší obsah nenasycených MK (vyšší DBI, PI a vyšší obsah vysoce polynenasycené n3 MK - DHA) u druhů s rychlejším metabolismem (Hulbert and Else, 1999; Hulbert, 2005). V dosavadních studiích však byla pozorována korelace opačná. Například v experimentální vnitrodruhové studii tkáňových fosfolipidů u myší byl zjištěn vyšší DBI a vyšší obsah DHA u jedinců selektovaných na nižší intenzitu metabolismu (Brzek et al., 2007). PUFA kvůli obsahu dvojných vazeb pomaleji metabolizují a produkce energie díky tomu může probíhat pomaleji, proto by mohly mít organismy s vysokým obsahem dvojných vazeb nižší intenzitu metabolismu (Bozek et al., 2017). Existují ale i mezidruhové studie tkáňových fosfolipidů savců (Valencak and Ruf, 2007) a vnitrodruhové studie tkáňových fosfolipidů norníků (*Myodes*

glareolus) selektovaných na vyšší BMR (Stawski et al., 2015) a myši (Wone et al., 2013), ve kterých žádná korelace intenzity metabolismu a složení membrán pozorována nebyla.

5.2 Hypotéza membrán jako strukturních antioxidantů

Na základě genetického výzkumu vznikla hypotéza, že membrány s vysokým obsahem PUFA mohou v organismu fungovat jako antioxidanty. PUFA mohou být, díky své vysoké citlivosti k peroxidaci, důležitým primárním místem pro zachycení a odbourání oxidantů v organismu a zabránit tak poškození jiných membránových molekul, jakými jsou například proteiny (Schmid-Siegert et al., 2016). Tato teorie by mohla vysvětlovat, proč studie nachází vyšší obsah polynenasycených MK u déle žijících živočichů (Valencak and Ruf, 2013; Galván et al., 2015).

5.3 Další vlastnosti mastných kyselin a jejich vliv na životní strategie

Existují názory, že důležitější, než celková nenasycenost membrán, může být poměr n6/n3 PUFA, a to nízký poměr pro déle žijící jedince (Valencak and Ruf, 2007; Valencak and Azzu, 2014). Důvodem může být, že n3 PUFA mají protizánětlivé vlastnosti, zatímco n6 PUFA vykazují souvislost s akcelerací zánětu. Nízký poměr n6/n3 PUFA může značit větší oxidační stabilitu pro organismus (Calder, 2003; Yates et al., 2014; Marion-Letellier et al., 2015). Pro intenzitu metabolismu se poměr n6/n3 PUFA u savců nezdá být významný (Valencak and Ruf, 2007).

Jednou z dalších vlastností MK, u které byl pozorován vztah s délkou života, je délka jejich řetězce. Výsledky dosavadních studií jsou však protichůdné. Zatímco délka řetězce korelovala s délkou života pozitivně v případě celkových lipidů v játrech ptáků (Galván et al., 2015), ve studii zaměřené na volné MK v krevní plazmě savců byla zjištěna korelace negativní (Jové et al., 2013). Relevance spojení mezi volnými MK v krevní plazmě a membránovými MK ale není zcela jasná.

Byly zjištěny i korelace délky řetězce s BMR, a to ve svalové tkáni norníka rudého, konkrétně vyšší obsah MK s delším řetězcem jedinců s vyšším BMR (Stawski et al., 2015). Délka řetězce by mohla být důležitá díky svému vlivu na strukturu membrány, a tím i na její fluiditu, kdy je delší řetězec MK zodpovědný za menší fluiditu (Yeagle, 2016). Mechanismus, jakým by

délka řetězce mohla ovlivňovat délku života není jasný, ale obsah více MK s dlouhým řetězcem v membránách by mohl být důležitý pro ochranu membrány před peroxidací (Galván et al., 2015).

6. PREDIKCE A CÍL PRÁCE

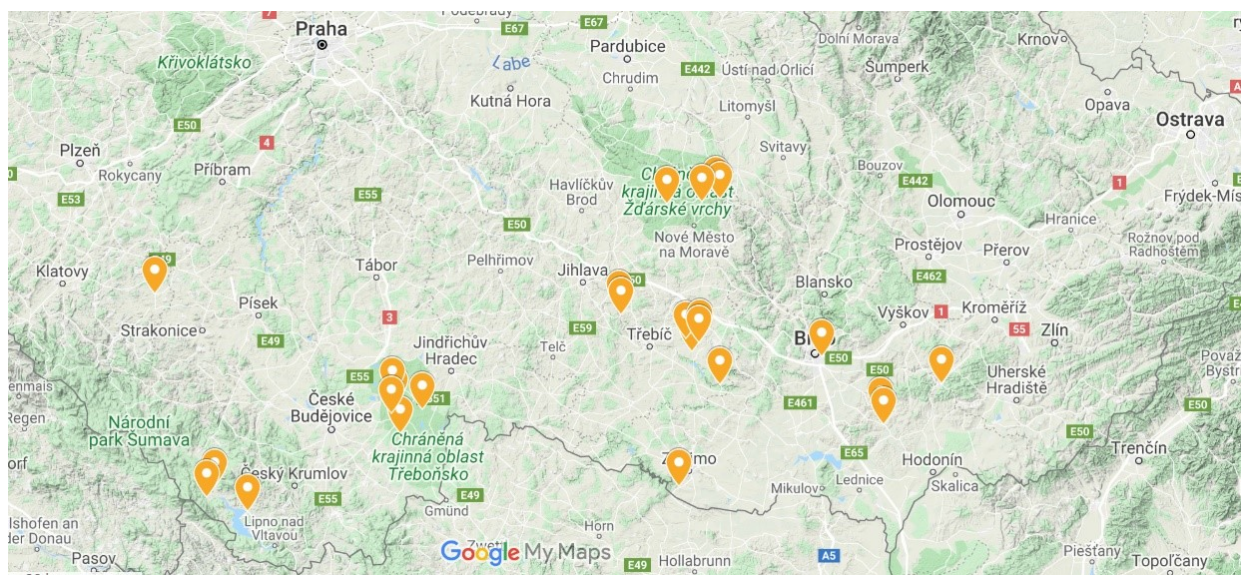
Pacemakerová hypotéza předpokládá, že zastoupení nenasycených MK v lipidových membránách má rozhodující vliv na intenzitu metabolických procesů a oxidačního stresu v organismu a může tak být důležitým faktorem determinujícím metabolický výdej a délku života organismu (Hulbert et al., 2007). Naopak hypotéza membrán jako strukturních antioxidantů, predikuje oproti MPTA, že vyšší nenasycenost je pro membrány výhodnější z hlediska odbourávání volných radikálů (Schmid-Siebert et al., 2016). Dále existuje empirické pozorování naznačující, že délka života může pozitivně korelovat s délkou řetězce membránových MK (Galván et al., 2015). Na základě výše uvedeného predikujeme, že složení lipidových membrán souvisí s životními strategiemi a intenzitou metabolismu a mělo by tedy vykazovat odpovídající latitudinální a elevační rozdíly. Cílem mé práce je otestovat následující konkrétní predikce.

- A. Tropičtí nížinní ptáci vykazují znaky pomalých životních strategií (malá snůška, vyšší míra přežívání dospělců) a mají nižší metabolický výdej. Dle MPTA u nich proto předpokládáme membránové MK s nižším stupněm nenasycenosti – zejména nižší obsah PUFA, které velmi snadno oxidují a jejichž efekt na zvýšení membránové fluidity je pouze o málo větší než u mnohem odolnějších MUFA. Podle teorie, která polynenasycené membrány považuje za strukturní antioxidanty, by pro pomalé životní strategie a vyšší odolnost membrán, mohl být charakteristický vysoký obsah membránových PUFA.
- B. Na základě předpokládané dlouhověkosti tropických ptáků (relativně k temperátním druhům) u nich predikujeme membránové MK s delším řetězcem.
- C. Druhy žijící ve vysokých nadmořských výškách mají vyšší energetické nároky na termoregulaci. Z toho důvodu u nich v případě platnosti MPTA predikujeme vyšší zastoupení nenasycených MK.
- D. Vzhledem k absenci jasných patrností v míře přežívání a dalších life-history znaků na tropických elevačních gradientech, nemáme ohledně délky řetězce jasné predikce. V tomto bodě má tedy moje práce exploratorní povahu. Vyšší zastoupení delších MK ve vyšších polohách by indikovalo spíše pomalejší životní strategie, které naznačují studie pocházející z temperátních oblastí.

7. MATERIÁL A METODIKA

7.1 Zkoumané druhy ptáků, odchyty a odběr vzorků

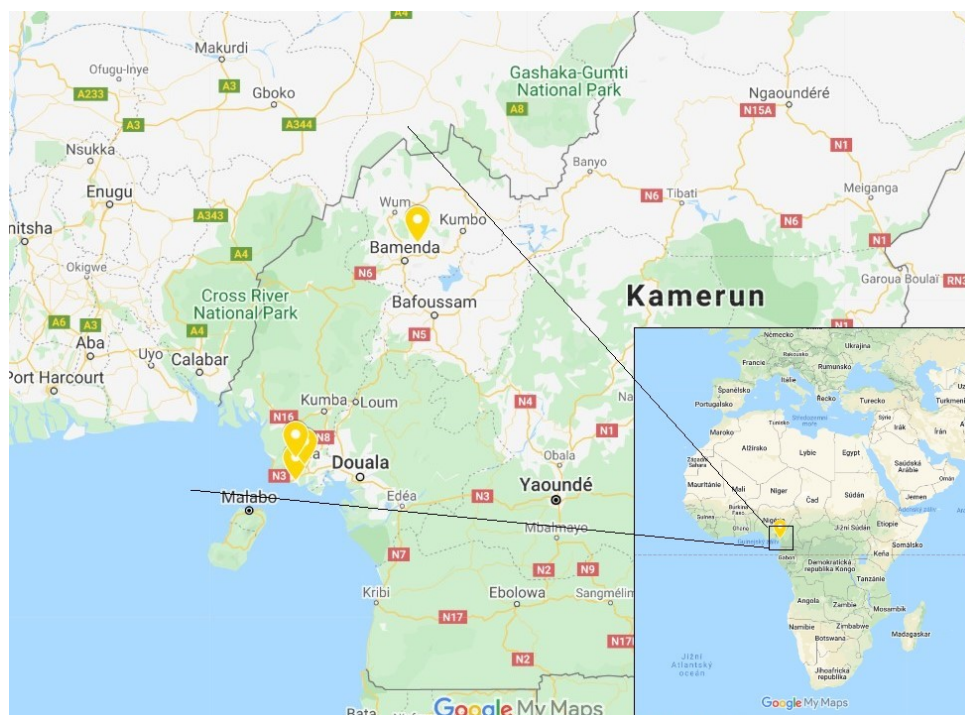
Studii jsme provedli na temperátních a tropických druzích pěvců, viz Tabulka S1, Obr. S1, Obr. S2. Pěvci byli zvoleni pro snadnost jejich odchyty do nárazových sítí. Data pro temperátní druhy pěvců byla sbírána od roku 2013 (od r. 2017 i s mojí účastí) v České republice. Lokality zahrnovaly mnoho různorodých biotopů, jako například okolí stojatých vod či řek, křoviny, rákosiny, lesy, zahrady nebo i obydlené oblasti. Nejvíce ptáků bylo pochyťáno v blízkém okolí obce Studenec (okres Třebíč), dále kolem Brna a na lokalitách v oblasti jižních Čech, na Třeboňsku, v okolí Českého Krumlova, Lipna a jiných; viz Obr. 5. Nadmořská výška odchyty se pohybovala od 180 do 730 m n. m. Zahrnuty byly jak druhy stálé, tak migranti na krátkou i dlouhou vzdálenost. Vzorky použité pro analýzy jsou pouze z hnízdní sezóny.



Obr. 5. Mapa odchyťových míst v ČR

Data z tropické oblasti byla taktéž sbírána od roku 2013 a pochází z afrického kontinentu, z Kamerunu. Většina vzorků pochází z jižní a jihozápadní části Kamerunské hory (Mt. Cameroon, Fako) zvedající se od pobřeží Guinejského zálivu a dále pak z několika dalších míst v okolí (Bimbria, Buea, Limbe) a ze severovýchodně vzdálenější lokality u města Babanki v Bamenda

Highlands (Obr. 6). Použité vzorky pocházejí z různých elevací (10 – 2280 m n. m.) a byly sbírány jak v období sucha (listopad – březen; vzorky sbírány v listopadu, prosinci a v únoru), tak v období dešťů (duben – listopad; vzorky sbírány v srpnu a září). Za účelem získání co nejširšího taxonomického spektra (v rámci pěvců) byli ptáci chytáni v různých biotopech zahrnujících primární a sekundární tropický les (Kamerunská hora, Bimbia, okolí Babanki), tropickou horskou savanu a křoviny (Kamerunská hora, okolí Babanki), zemědělské kultury a přilehlé ruderaly (úpatí Kamerunské hory, Buea, okolí Babanki) a urbanizovaná území (Buea, Limbe).



Obr. 6. Mapa odchyťových míst v Kamerunu.

Pěvci byli odchyťováni pomocí ornitologických nárazových sítí kdykoliv během dne, nejčastěji však v brzkých ranních hodinách. Ptákům byl po odchytu odebrán vzorek krve z jugulární žíly o objemu dle velikosti druhu (cca 0,1 – 0,4 ml; < 1 % hmotnosti těla; (Fair and Jones, 2010), který byl okamžitě uskladněn v tekutém dusíku pro analýzu mastných kyselin a v 96% ethanolu pro analýzy DNA. Použití krve pro korelační studie zahrnující velký počet jedinců je vhodné především proto, že živočicha není nutno usmrtit. Před vypuštěním zpět do volné přírody byl každý pták změřen, zvážen a označen ornitologickým kroužkem Národního Muzea v Praze.

7.2 Genetické určení pohlaví

Jedna z proměnných, která byla zahrnuta do analýz, je pohlaví. Tropické druhy ptáků jsou často monomorfní, u některých proto není možné určit v terénu pohlaví správně. Ani u dimorfních druhů ale určení pohlaví nemusí být zcela jednoduché, pokud se juvenilní samčí jedinec podobá samici. U těchto druhů byly k určení pohlaví využity molekulární metody.

Pro testování byly použity krevní vzorky uložené v 96 % ethanolu. Z nich byla pomocí izolačního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) izolována DNA. Pohlaví bylo určováno pomocí dvou setů primerů. První z nich, navržený Griffiths et al. (1998), využívá CHD1 (*chromo-helicase-DNA-binding protein 1*) geny, které se nachází na pohlavních chromosomech většiny ptáků u obou pohlaví, ale liší se svojí délkou intronu. Heterogametickým pohlavím jsou u ptáků samice s pohlavními chromozomy Z a W. Pohlavní chromozom W obsahuje CHD-W gen a nacházíme ho pouze u samic. CHD-Z gen se nachází na pohlavním chromozomu Z, a to jak u samců s pohlavními chromozomy ZZ, tak u samic. K amplifikaci různě dlouhých intronů u CHD1-W a CHD1-Z genů byly použity v původním článku navržené primery P2 (přední se sekvencí 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') a P8 (zadní se sekvencí 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). Pro PCR reakci bylo ke každému vzorku vyizolované DNA (5 µl) přidáno 10 µl směsi obsahující 1 µl od každého primeru: CHD1-P2 (0,01 mM), CHD1-P8 (0,01 mM), směs nukleotidů (1,5 µl; 2mM), Taq DNA polymerázu (0,1 µl; 5U/µl Biotools), standardní reakční pufr s MgCl₂ (1,5 µl; 10x Standard Reaction Buffer with MgCl₂; Biotools) a destilovanou vodu (4,9 µl). Cílový fragment CHD1 byl amplifikován pomocí PCR v termocycleru Mastercycler (Eppendorf) nebo T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) s pomocí následujícího programu: iniciační denaturační teplota 94 °C po dobu 90 sekund, následovaná 30 cykly 48 °C (45 s), 72 °C (45 s) a 94 °C (30 s) a konečným cyklem s teplotami 48 °C (60 s) a 72 °C (5 min) (Griffiths et al., 1998).

Druhou metodou, která by měla fungovat i pro DNA horší kvality, je set primerů vyvinutý autory Bantock et al. (2008). Ta je založena na amplifikaci různě dlouhých intronů ATP5A1 (*ATP synthase subunit alpha*)-W a ATP5A1-Z genů pomocí primerů F2 (přední se sekvencí 5'-GCTGTRGACAGYTTGGT-3') a R1 (zadní se sekvencí 5'-ATYGTTTYTGGTTRATTATTG-3'). Směs pro PCR byla připravena stejným způsobem jako u první metody a PCR byla provedena s následujícím programem: iniciační cyklus při 94 °C (8 min), 40 cyklů teplot 48 °C (30 s), 72 °C

(30 s), 94 °C (60 s) a závěrečný cyklus o teplotách 48 °C (2 min) a 72 °C (2 min) (Bantock et al., 2008).

PCR produkty byly u obou metod separovány elektroforézou trvající 80 minut, při napětí 100 V/cm na 3% agarózovém gelu s obsahem ethidium bromidu. Pro zobrazení a vyhodnocení výsledků byl využit program AlphaDigiDoc®RT. Amplifikované introny CHD1 a ATP5A1 se na chromozomech Z a W liší velikostí, proto je možné po rozdělení fragmentů při elektroforéze odečíst dva (Z a W, samice) či pouze jeden (Z, samec) proužek, viz Obr. S3Obr. S4 (Griffiths et al., 1998; Bantock et al., 2008).

V některých případech nebylo možné určit pohlaví pomocí elektroforézy ani jednou z metod. Takové vzorky byly analyzovány fragmentační analýzou (Synek et al., 2015). PCR směs pro potřeby této analýzy zahrnovala vyizolovanou DNA (3 µl), ke které bylo přidáno 5 µl směsi, obsahující 0,02 µl od každého z primerů: CHD1-P2 (0,1 mM), CHD1-P8-6-FAM (0,1 mM), ATP5A1-R1-6-FAM (0,1 mM), ATP5A1-F2 (0,1 mM), kdy vždy jeden z dvojice primerů obsahuje 6-FAM fluorescenční barvivo; 0,92 µl destilované vody a 4 µl Multiplex Type-It Microsatellite PCR Kit (Qiagen). PCR program byl nastaven na iniciační teplotu 95 °C (5 min), následovanou 30 cykly 95 °C (30 s), 50 °C (90 s), 72 °C (30 s), zakončeno 60 °C (30 s). Po skončení PCR byl použit 1 µl této amplifikované PCR směsi a ke každému vzorku přidán formamid (9 µl) a GeneScan 500LIZ Size Standard (0,3 µl). Takto připravené vzorky byly denaturovány po dobu 2 minut a následně analyzovány pomocí sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Přírodovědecké fakultě v Praze, Viničná 7 (Laboratoř sekvence DNA). K vyhodnocení výsledků byl použit software GeneMarker 1.9 (Softgenetics), viz Obr. S5.

7.3 Sběr ekologických dat

Do analýz byly zahrnuty z literatury získané informace o potravě (Wilman et al., 2014), která může mít z dlouhodobého hlediska vliv na složení membrán (Escudero et al., 1998; Faulks et al., 2006; Valencak and Ruf, 2011). Ptáci byli zařazeni do čtyř kategorií: insektivori, herbivoři, omnivoři a nektari-/frugi-voři.

Informace o nadmořských výškách byly získány jak z literatury (del Hoyo et al., 2020; Quintero and Jetz, 2018), tak z dat získaných v rámci paralelního projektu zaměřeného na výzkum ptačích společenstev na Kamerunské hoře (Sedláček et al., nepublikovaná data).

Migrační vzdálenost byla určována podle dat druhových areálů (del Hoyo et al., 2020) změřením vzdálenosti mezi středy hnízdních areálů a zimovišť pomocí Google Maps.

7.4 Analýza mastných kyselin

Vybrané vzorky pro analýzu mastných kyselin v krevních fosfolipidech byly zpracovány v Laboratoři analytické biochemie a metabolomiky Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Metoda, která byla použita pro separaci esterů mastných kyselin (*fatty acids methyl ester*; FAME) byla plynová chromatografie (*gass chromatography*; GC) a pro následnou detekci byla využita hmotnostní spektrometrie (*mass spektrometry*; MS).

Z krevních vzorků byly nejprve získány deriváty esterů mastných kyselin (FAMEs). Transesterifikací MK pomocí methoxidu sodného. Vzorek s obsahem MK byl smíchán s 5 μ l vnitřního standardu D33-C17 (0,1 nmol/ μ l), 50 μ l hexanu a 100 μ l methoxidu sodného (2M), následně 15 minut míchán, poté opět přidáno 50 μ l hexanu a 250 μ l HCl (1M) a po oddělení fází, po 1 minutě promíchání, byla hexanová fáze přenesena do nové zkumavky. Zbytek směsi byl reextrahován 200 μ l hexanu. Hexanové fáze byly následně odpařeny rotační vakuovou odparkou (Jouan RC 10.10 and RCT 60, Saint Herblain, France). Získané FAME byly rozpuštěny ve 100 μ l isooktanu a 0,1 a 1 μ l alikvoty byly vstříknuty do plynového chromatografu (Trace 1300) spojeného s ISQ kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Thermo Fisher San Jose, CA, USA). Separace i kvantifikace FAME probíhala na ZB-FAME kapilární koloně (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), při nastavení na průtok helia 1,1 ml/min; vstupní teplotou 220 °C; režim vstřikování – dělený tok (split), 20 ml/min, po dobu 1,75 min; s režimem teploty kolony 70 °C (2 min), a následným postupným zvyšováním teploty o 15 °C/min až na 180 °C (6 min). Poté byla teplota opět postupně zvyšována o 10 °C/min až na 230 °C (1 min); transfer-line teplota 280 °C; teplota zdroje elektronových iontů 220 °C a ionizační energie 70 eV.

Z koncentrací různých MK (Tabulka 2), které každý vzorek obsahoval, byly vypočítány poměry jednotlivých MK a z nich následně **membránové indexy** vyjadřující různé aspekty složení

membrán: poměrné zastoupení nasycených MK (SFA), polynenasycených MK (PUFA; n3 PUFA; n6 PUFA), mononenasycených MK (MUFA), poměr n3 PUFA/n6 PUFA; double-bond index, DBI = $[(1 \times \sum \text{mol\% monoenové MK}) + (2 \times \sum \text{mol\% dienové MK}) + (3 \times \sum \text{mol\% trienové MK}) + (4 \times \sum \text{mol\% tetraenové MK}) + (5 \times \sum \text{mol\% pentaenové MK}) + (6 \times \sum \text{mol\% hexaenové MK})]$; a průměrnou délku řetězce (*average chain length*), ACL = $[(\sum \% \text{Total14} \times 14) + (\sum \% \text{Total15} \times 15) + (\sum \% \text{Total16} \times 16) + (\sum \% \text{Total17} \times 17) + (\sum \% \text{Total18} \times 18) + (\sum \% \text{Total20} \times 20) + (\sum \% \text{Total21} \times 21) + (\sum \% \text{Total22} \times 22) + (\sum \% \text{Total23} \times 23) + (\sum \% \text{Total24} \times 24)]/100$ (Galván et al., 2015).

MK		název	% zastoupení naměřených hodnot MK
SFA	C14	k. myristová	0,11 - 6,09
	C15	k. pentadecylová	0,04 - 1,63
	C16	k. palmitová	16,11 - 50,57
	C17	k. heptadecylová	0,06 - 5,28
	C18	k. stearová	6,81 - 46,95
	C20	k. arachová	0,14 - 6,55
	C21	k. heneikosanová	0 - 0,99
	C22	k. behenová	0,06 - 6,45
	C23	k. trikosanová	0 - 0,52
	C24	k. lignocerová	0 - 2,08
MUFA	C16:1n7	k. palmitolejová	0,06 - 12,47
	C18:1n9	k. olejová	3,69 - 29,93
	C20:1n9	k. eikosenová	0 - 2,16
	C22:1n9	k. eruková	0 - 0,33
	C24:1n9	k. nervonová	0 - 0,87
n3 PUFA	C18:3n3	k. α-linoleová	0 - 14,22
	C20:5n3	k. eikosapentaenová	0 - 9,39
	C22:6n3	k. dokosahexaenová	0,047 - 10,575
n6 PUFA	C18:2n6	k. linolová	1,11 - 40,77
	C18:3n6	k. γ-linolenová	0 - 1,49
	C20:2n6	k. eikosadienová	0 - 2,02
	C20:3n6	k. -8,11,14-eikosatrienová	0 - 2,79
	C20:4n6	k. arachidonová	0,11 - 20,44

Tabulka 2. Naměřené rozmezí procentuálního zastoupení MK v membránách studovaných tropických i temperátních druhů pěvců.

7.5 Statistická analýza

Všechny analýzy probíhaly v programu R 3.6.2. (R Core Team, 2019). Proměnné odchylovající se od Gaussovského rozložení byly transformovány pomocí funkce „logit“ (balíček „car“; Fox et al., 2020) v případě poměrných veličin (tzn. vyjádřených v rozmezí 0 až 1; MUFA, PUFA, SFA) nebo přirozeným logaritmem v případě ostatních proměnných (n6/n3 PUFA, PI, ACL, hmotnost).

Pro vyjádření přesnosti metody měření byla vypočítána opakovatelnost (R; *repeatability*) založená na duplicitních měřeních 35 vzorků. Za účelem zhodnocení mezidruhových rozdílů ve složení membrán byla dále analyzována opakovatelnost membránových indexů v rámci druhu. Výpočty opakovatelnosti byly provedeny pomocí balíčku „rptR“ (Stoffel et al., 2017).

Data byla analyzována pomocí Bayesovských fylogenetických regresních modelů implementovaných v balíčku „brms“ (Bürkner, 2017). Tento typ modelů byl využit z toho důvodu, že umožňuje fylogeneticky kontrolovanou analýzu založenou na individuálních datech (de Villemereuil and Nakagawa, 2014). Jako informace o fylogenezi bylo použito všech 10 000 stromů uložených na BirdTree.org (Hackett et al., 2008; Jetz et al., 2012). Z těchto dat byl vytvořen konsenzuální fylogenetický strom v programu TreeAnnotator implementovaném v softwaru BEAST 1.10.1 (Suchard et al., 2018). Fylogeneze byla vložena do modelů jako náhodná proměnná spolu s další náhodnou proměnnou kontrolující na podobnost měření v rámci druhu nezávisle na fylogenezi (de Villemereuil and Nakagawa, 2014). Závislými proměnnými v těchto modelech byly jednotlivé membránové indexy.

Nejprve byl spočítán celkový fylogenetický signál (značen jako lambda λ ; Pagel, 1999) vyjadřující kolik variability ve složení membrán lze vysvětlit sdílenou evoluční historií. Za tímto účelem byly sestaveny modely bez fixních efektů a s výše uvedenými náhodnými efekty fylogeneze a druhu. Fylogenetický signál byl spočítán jako podíl variance vysvětlené fylogenezí z celkové variance (de Villemereuil and Nakagawa, 2014).

Pro analýzu vlivu zeměpisné šířky byly použity pouze nížinné druhy, tedy všechny druhy odchycené v temperátu a tropické druhy s dolní hranicí areálu 600 m. n. m. a níže a s horní hranicí areálu maximálně 1900 m. n. m. (celkem 291 různých jedinců 87 druhů). Model pro testování vlivu zeměpisné šířky obsahoval jako hlavní fixní efekt kategorickou proměnnou označující zda druh hnízdí v mírném pásu (kódováno jako 0) nebo v tropech (kódováno jako 1).

Model dále kontroloval na následující fixní efekty: druhově specifickou hmotnost těla (g), pohlaví, typ potravy (herbivorie, nektarivorie/frugivorie, insektivorie, omnivorie) a migrační vzdálenost (tisíce km).

Pro analýzu vlivu nadmořské výšky byly použity všechny tropické druhy (celkem 244 různých jedinců 72 druhů). Model používal jako hlavní fixní efekt proměnnou průměrné druhově specifické nadmořské výšky a kontroloval na další fixní efekty, kterými byla druhově specifická hmotnost těla (g), pohlaví, typ potravy (herbivorie, nektarivorie/frugivorie, insektivorie, omnivorie) a období rozmnožování.

Kontinuální proměnné (membránové indexy, hmotnost těla a migrační vzdálenost) byly před použitím v modelu centrovány odečtením průměrné hodnoty a standardizovány vydělením hodnoty směrodatné odchylky (z-transformace) za účelem získání standardizovaných efektů. Model byl nastaven na 10 MCMC řetězců, každý po 6 000 iteracích, přičemž prvních 2 000 iterací bylo zahozeno (*warmup*) a poté byla uložena každá 20. iterace (*thining*). Výsledný počet uložených iterací byl tedy 2 000. Výsledná efektivní velikost vzorku (ESS; *Effective Sample Size*) byla u všech modelů minimálně 1582. Konvergence řetězců byla hodnocena pomocí Gelmanovy-Rubinovi statistiky (\hat{R}) implementované v „brms“. Konvergence všech prezentovaných modelů byla adekvátní ($\hat{R} < 1,01$). Výsledné odhady koeficientů jsou uvedené s 95% intervaly kredibility (CI) [l-95% CI; u-95% CI] určenými prostřednictvím kvantilů (výchozí způsob v balíčku „brms“).

Grafická znázornění byla tvořena pomocí balíčku „ggplot2“.

8. VÝSLEDKY

8.1 Opakovatelnost měření membránových indexů

Statistickou analýzou duplicitně měřených vzorků ($N = 35$) byla zjištěna vysoká opakovatelnost laboratorního měření mastných kyselin. Výsledná opakovatelnost analyzovaných membránových indexů je uvedena v Tabulce 3.

	R	[l-95% CI; u-95% CI]
DBI	0,998	[0,996; 0,999]
ACL	0,990	[0,979; 0,994]
PUFA	0,994	[0,988; 0,997]
MUFA	0,999	[0,998; 0,999]
SFA	0,999	[0,998; 0,999]
n6/n3 PUFA	0,948	[0,902; 0,974]

Tabulka 3. Opakovatelnost měření membránových indexů.

8.2 Mezidruhová variabilita a vliv fylogeneze

U všech indexů byla zjištěna středně vysoká opakovatelnost v rámci druhu (Tabulka 4). Tento výsledek indikuje, že jednotlivé aspekty složení membrán jsou druhově specifické znaky a mohou tedy podléhat evoluci na základě přírodního výběru.

	R	[l-95% CI; u-95% CI]
DBI	0,526	[0,427; 0,606]
ACL	0,525	[0,427; 0,609]
PUFA	0,541	[0,451; 0,624]
MUFA	0,588	[0,493; 0,663]
SFA	0,516	[0,426; 0,601]
n6/n3 PUFA	0,593	[0,504; 0,671]

Tabulka 4. Opakovatelnost každého z indexů v rámci druhu ($N_{\text{jedinců}} = 493$, $N_{\text{druhů}} = 133$). Opakovatelnost byla spočítána pomocí mixovaných modelů, ve kterých byly jednotlivé indexy zahrnuty jako závislé proměnné a druh jako náhodná vysvětlující proměnná.

U všech indexů byl dále detekován středně silný fylogenetický signál, který vyjadřuje, že variabilitu jednotlivých indexů lze více než z poloviny vysvětlit sdílenou evoluční historií studovaných druhů (Tabulka 5).

	λ	[l-95% CI; u-95% CI]
DBI	0,60	[0,32; 0,78]
ACL	0,56	[0,26; 0,77]
PUFA	0,63	[0,39; 0,78]
MUFA	0,57	[0,33; 0,76]
SFA	0,54	[0,26; 0,75]
n6/n3 PUFA	0,65	[0,45; 0,79]

Tabulka 5. Fylogenetický signál membránových indexů ($N_{\text{jedinců}} = 458$, $N_{\text{druhů}} = 133$).

8.3 Vliv zeměpisné šířky na nenasycenost MK

Pro analýzu vlivu zeměpisné šířky bylo k dispozici 208 vzorků od různých jedinců 61 druhů z nížinných temperátních oblastí a 83 vzorků od různých jedinců 26 druhů z nížinných tropických oblastí (Tabulka S1, Obr. S1). Výsledné odhady standardizovaných efektů shrnují Tabulka 6 a Graf 1. Nenasycenost signifikantně korelovala s velikostí těla. Konkrétně byla u větších jedinců pozorována vyšší míra nenasycenosti (DBI), zapříčiněná vyšším obsahem PUFA a nižším obsahem SFA. Na podíl MUFA neměla velikost těla žádný vliv.

Výsledky naznačují, že nezávisle na vlivu velikosti těla mají tropičtí ptáci s 96% posteriorní pravděpodobností (jednostranný test) vyšší míru nenasycenosti oproti druhům temperátním (Graf 1). Interval kredibility však zahrnoval nulu a výsledek tedy není podle tohoto kritéria signifikantní. Tento trend byl způsoben zejména vyšším zastoupením PUFA a nižším zastoupením MUFA u tropických druhů. Tropičtí ptáci měli též tendenci k nižšímu zastoupení SFA, ale s intervalem kredibility opět těsně zahrnujícím nulu (posteriorní pravděpodobnost 96 %).

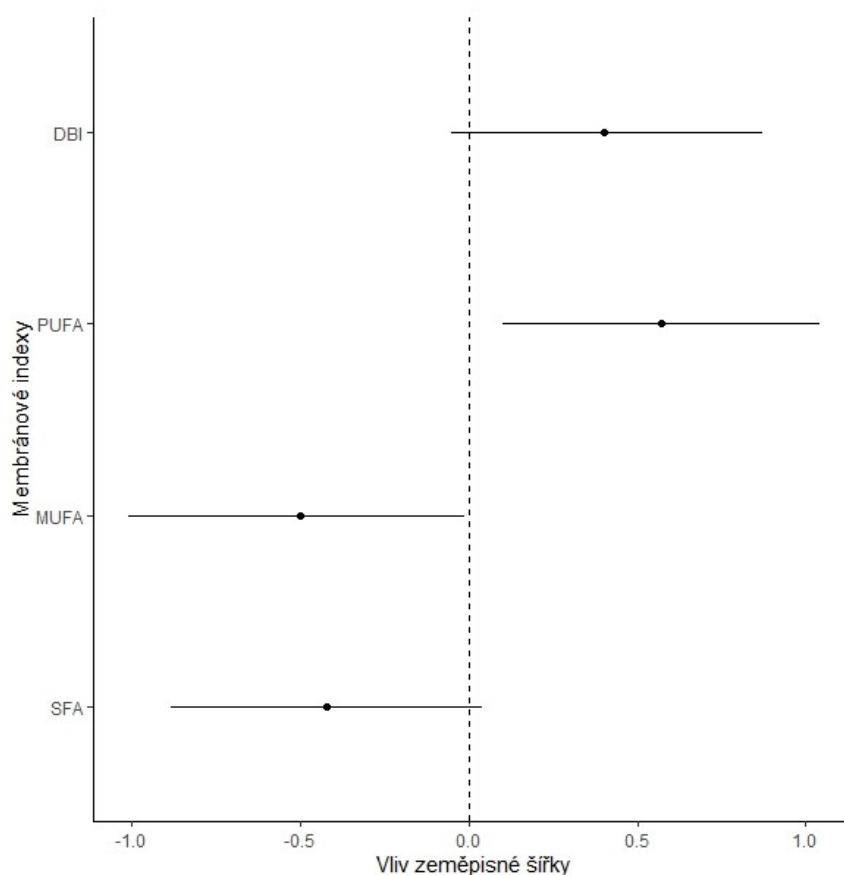
Data dále odhalila, že samci mají nižší nenasycenost membránových fosfolipidů, což indikuje vyšší zastoupení nasycených MK (Tabulka 6). Vyšší podíl nasycených MK byl vyvážen především nižším zastoupením MUFA a pravděpodobně i nižším obsahem PUFA (posteriorní pravděpodobnost 96 %, interval kredibility však zahrnoval nulu).

Rozdíly v potravních strategiích příliš vliv na nenasycenost MK neměly (příloha - Graf S1Graf S2Graf S3Graf S4). Signifikantní byl nalezen pouze vyšší obsah MUFA u nektarivorních druhů ve srovnání s ostatními, ale tento výsledek by mohl být artefaktem způsobeným nízkým počtem nektarivorních druhů ($N_{\text{nektar.druhů}} = 2$, $N_{\text{nektar.jedinců}} = 6$; Graf S3).

Mezi nenasyceností MK a migrační vzdáleností žádné signifikantní korelace pozorovány nebyly.

Závislá proměnná	Koeficient [l-95% CI; u-95% CI]			
	DBI	SFA	MUFA	PUFA
Intercept	0,45 [-0,36; 1,37]	-0,64 [-1,62; 0,27]	-0,17 [-1,27; 0,89]	0,56 [-0,46; 1,64]
Velikost těla	0,37 [0,21; 0,54]	-0,35 [-0,51; -0,18]	0,02 [-0,14; 0,20]	0,32 [0,16; 0,49]
Pohlaví (samec)	-0,21 [-0,38; -0,03]	0,29 [0,11; 0,47]	-0,3 [-0,48; -0,13]	-0,16 [-0,34; 0,02]
Insektivorie	-0,49 [-1,08; 0,13]	0,58 [-0,07; 1,22]	0,48 [-0,23; 1,21]	-0,65 [-1,26; 0,04]
Nektari/frugivorie	0,18 [-1,02; 1,47]	-0,47 [-1,82; 0,86]	2,83 [1,46; 4,17]	-0,81 [-2,09; 0,58]
Omnivorie	-0,24 [-0,85; 0,42]	0,30 [-0,36; 0,97]	0,50 [-0,25; 1,27]	-0,41 [-1,09; 0,32]
Migrační vzdálenost	0,04 [-0,14; 0,24]	-0,15 [-0,34; 0,04]	0,12 [-0,08; 0,33]	0,09 [-0,12; 0,28]
Latituda (tropy)	0,37 [-0,08; 0,85]	-0,42 [-0,88; 0,04]	-0,5 [-1,01; -0,01]	0,57 [0,10; 1,04]

Tabulka 6. Model vlivu latitudy na nenasycenost MK ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Tučně zvýrazněné jsou koeficienty, jejichž 95% intervaly kredibility nezahrnují nulu. $N_{\text{jedinců}} = 291$, $N_{\text{druhů}} = 87$. U všech modelů bylo $ESS \geq 1799$ a $\hat{R} < 1,01$.



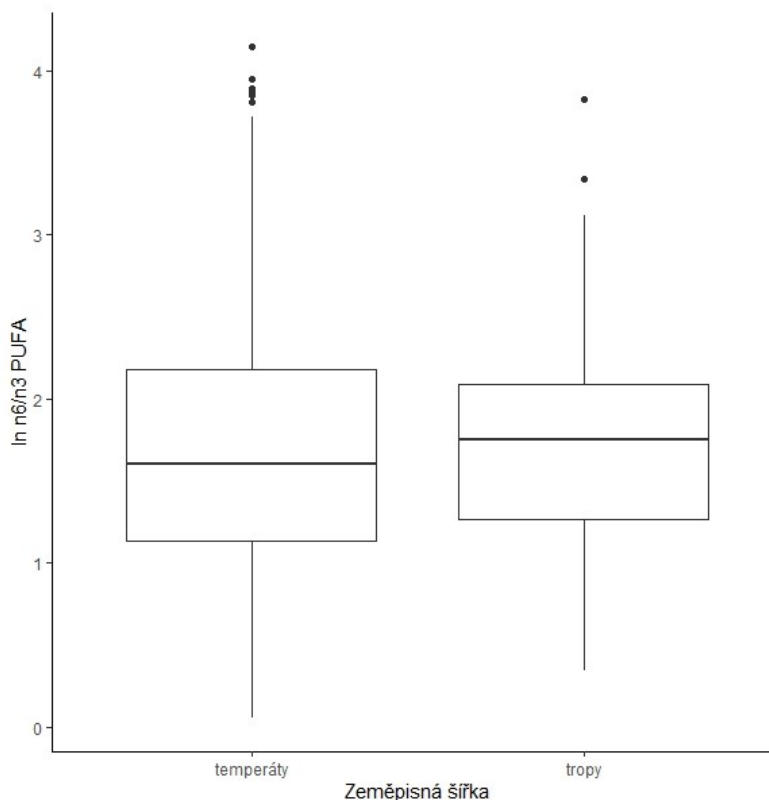
Graf 1. Vliv zemské šířky (tropy vs. temperát) na nenasycenost MK ve fosfolipidech červených krvinek. Znázorněny jsou posteriorní odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility. Pozitivní koeficienty znamenají vyšší hodnoty indexů u tropických ptáků.

8.4 Vliv zeměpisné šířky na poměr n6/n3 PUFA

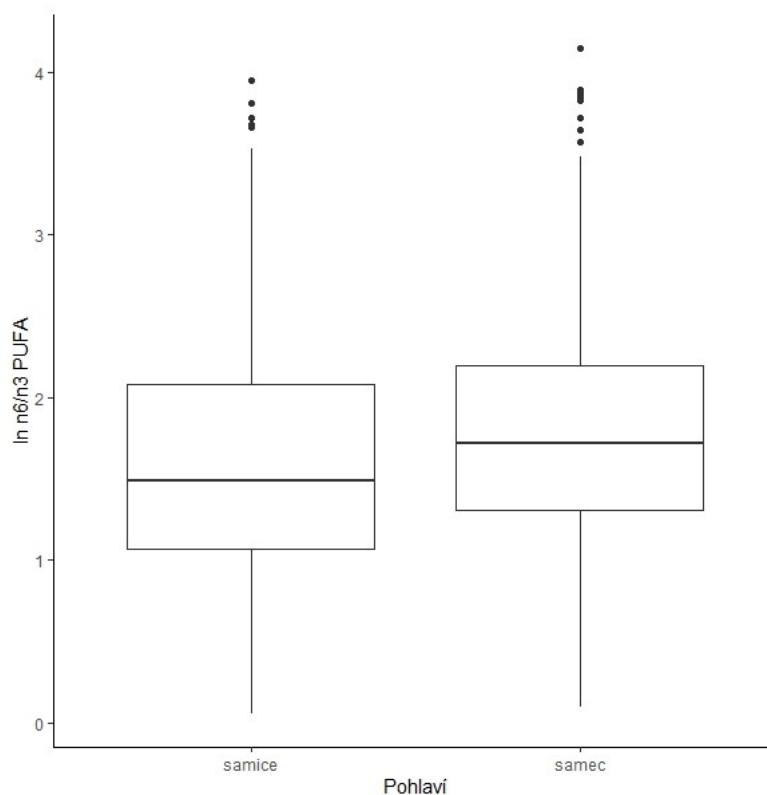
Dle našich výsledků (Tabulka 7) vykazoval poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek vztah s velikostí těla a pohlavím (Graf 3), konkrétně vyšší hodnoty u menších druhů a u samčích jedinců. Nebyl však pozorován žádný vliv zeměpisné šířky (Graf 2), ani potravních strategií. S 96% posteriorní pravděpodobností poměr také negativně koreloval s migrační vzdáleností, intervaly kredibility však zahrnovaly nulu.

n6/n3 PUFA	Koeficient	l-95% CI	u-95% CI
Intercept	0,22	-1,17	1,42
Velikost těla	-0,26	-0,44	-0,07
Pohlaví (samec)	0,21	0,06	0,38
Insektivorie	-0,58	-1,32	0,22
Nektari/frugivorie	-1,18	-2,58	0,29
Omnivorie	-0,65	-1,42	0,18
Migrační vzdálenost	-0,18	-0,40	0,03
Latituda (tropy)	0,10	-0,41	0,61

Tabulka 7. Model vlivu latitudy na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Tučně zvýrazněné jsou koeficienty, jejichž 95% intervaly kredibility nezahrnují nulu. $N_{\text{jedinců}} = 291$, $N_{\text{druhů}} = 87$ druhů. U všech výsledků je $ESS \geq 1582$ a $\hat{R} < 1,01$.



Graf 2. Vliv zeměpisné šířky na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro poměr n6/n3 PUFA nevykazující žádný signifikantní rozdíl mezi tropickými a temperátními oblastmi.



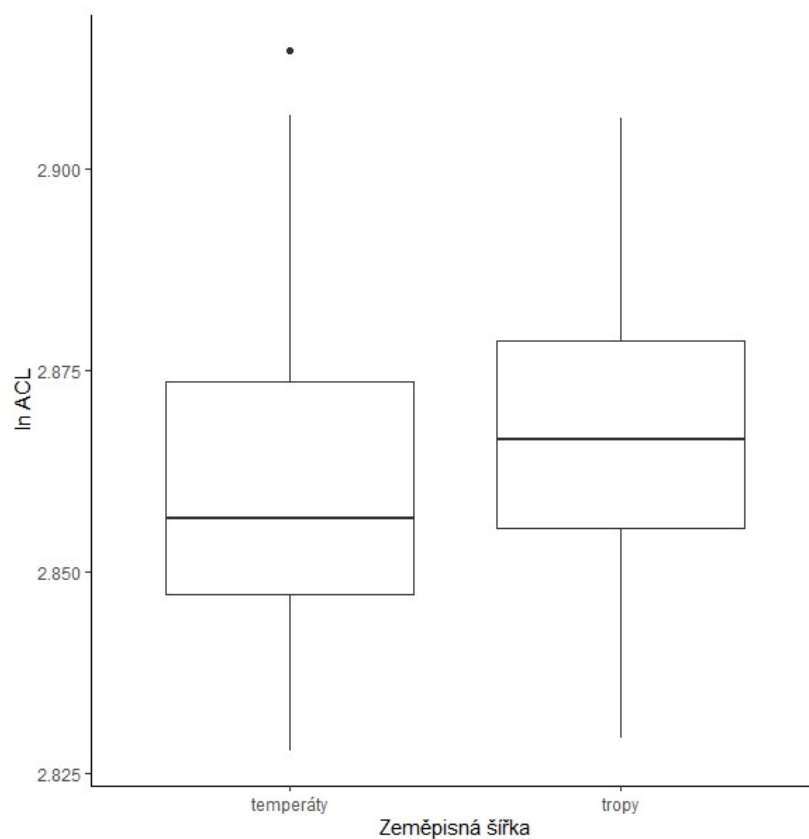
Graf 3. Vliv pohlaví na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro poměr n6/n3 PUFA vykazující vyšší poměr u samčích jedinců. $N_{\text{samec}} = 156$, $N_{\text{samice}} = 135$.

8.5 Vliv zeměpisné šířky na délku řetězce MK

Dalším testovaným indexem byla průměrná délka řetězce (ACL) MK, pro kterou nebyly nalezeny žádné signifikantní výsledky v 95% intervalech kredibility. Jednostranné testy však ukázaly, že s 96% posteriorní pravděpodobností korelovala pozitivně s velikostí těla a se stejnou pravděpodobností byla nezávisle na velikosti těla u tropických ptáků nalezena vyšší průměrná délka řetězce MK, oproti druhům temperátním (Graf 4). S potravou (Graf S6), pohlavím, či migrační vzdáleností žádný vztah pozorován nebyl.

ACL	Koeficient	l-95% CI	u-95% CI
Intercept	0,30	-0,59	1,32
Velikost těla	0,16	-0,03	0,34
Pohlaví (samec)	0,08	-0,10	0,26
Insektivorie	-0,48	-1,15	0,22
Nektari/frugivorie	-0,78	-2,12	0,63
Omnivorie	-0,18	-0,89	0,52
Migrační vzdálenost	-0,08	-0,30	0,14
Latituda (tropy)	0,46	-0,05	0,97

Tabulka 8. Model vlivu latitudy na délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Žádný z výsledků nevykazuje signifikanci v 95 % intervalech kredibility. $N_{\text{jedinců}} = 291$, $N_{\text{druhů}} = 87$ druhů. U všech výsledků je $ESS \geq 1780$ a $\hat{R} < 1,01$.



Graf 4. Vliv zeměpisné šířky na průměrnou délku řetězce ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro ACL.

8.6 Vliv nadmořské výšky na nenasycenost MK

Pro analýzu vlivu nadmořské výšky bylo k dispozici 244 vzorků od různých jedinců 72 tropických druhů pěvců (**Tabulka S1. Temperátní a tropické druhy pěvců použité pro analýzy**. Tučně zvýrazněné jsou druhy, které byly použity pro analýzu latitudinálních rozdílů. Pro analýzu elevačních rozdílů byly použity všechny tropické druhy v této tabulce. Tabulka S1, Obr. S2). Výsledné odhady standardizovaných efektů shrnuje Tabulka 9 a Graf 5. Podobně jako u modelů testujících vliv latitudy, velikost těla vykazovala opět korelace s nenasyceností MK, v tomto případě všechny signifikantní. Se stoupající hmotností se zvyšovala míra nenasycenosti, a tedy obsah PUFA a naopak klesal obsah MUFA a SFA.

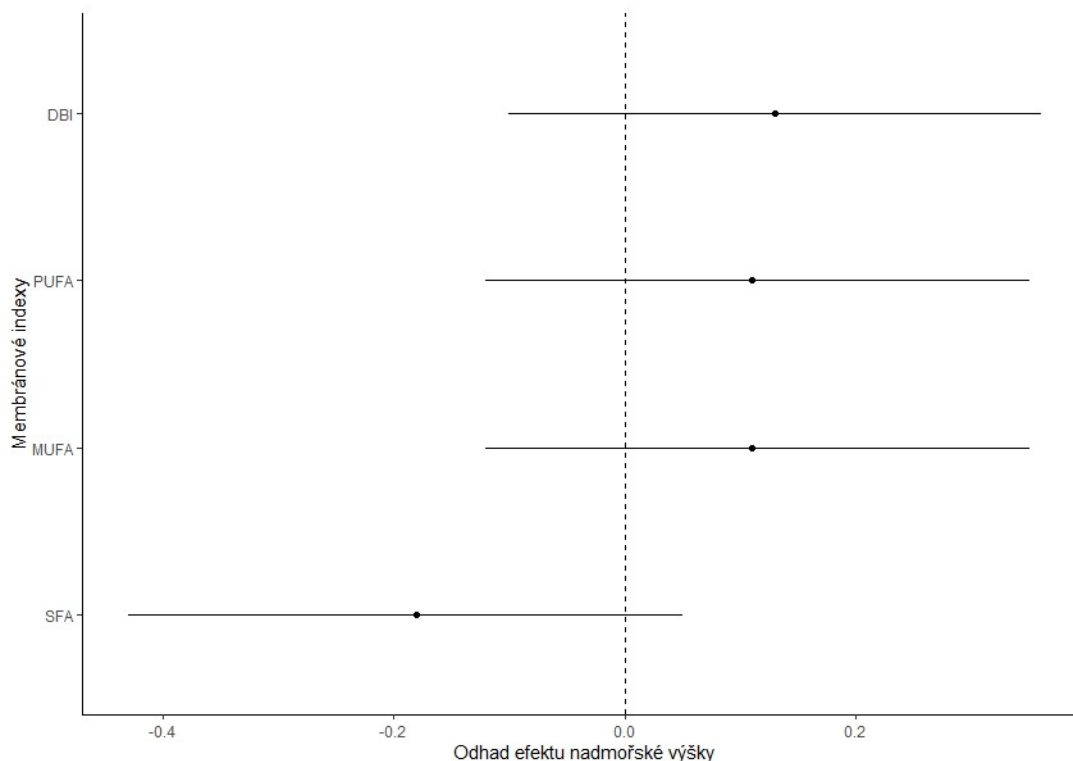
Z našich výsledků nevyplývá žádná signifikantní závislost nenasycenosti MK na nadmořské výšce specifické pro dané druhy (Graf 5. – 9.). Signifikantní korelace se ale našly při porovnání nenasycenosti MK s konkrétními elevacemi odchyty jedinců. To naznačuje absenci genetických rozdílů mezi nížinými a horskými druhy, ale existenci vnitrodruhové plasticity závislé na nadmořské výšce. Konkrétně byla pozorována vyšší nasycenost MK ve vyšších polohách, tedy nižší DBI a s tím související nižší obsah PUFA a naopak vyšší obsah SFA ve vyšších polohách. Na podíl MUFA neměla nadmořská výška žádný vliv.

Oproti modelu testujícímu rozdíl v míře nenasycenosti membrán mezi tropickými a temperátními druhy byl v elevačním modelu zahrnujícím pouze druhy tropické pozorován pouze jediný signifikantní rozdíl mezi pohlavími, konkrétně nižší podíl MUFA u samčích jedinců.

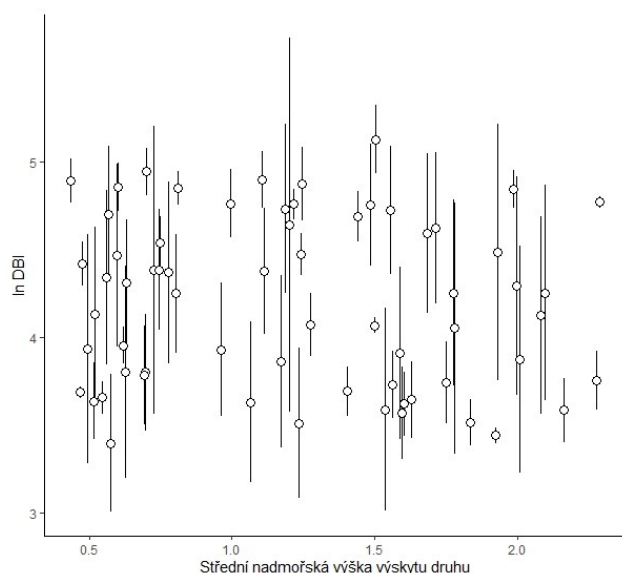
Podobně jako v latitudinálním modelu neměly potravní strategie příliš vliv na nenasycenost MK ani v případě elevačních modelů (příloha - Graf S7, Graf S8, Graf S9, Graf S10). Pozorovat bylo možné pouze rozdíly v zastoupení MUFA, konkrétně jejich vyšší obsah u nektarivorních a omnivorních druhů ve srovnání s druhy herbivorními a insektivorními (Graf S9). Z hlediska vlivu období rozmnožování na nenasycenost MK žádné signifikance ani tendence pozorovány nebyly.

Koeficient [l-95% CI; u-95% CI]				
Závislá proměnná	DBI	SFA	MUFA	PUFA
Intercept	0,06 [-0,81; 1,06]	0,18 [-0,94; 1,11]	-0,61 [-1,78; 0,66]	0,27 [-0,71; 1,40]
Velikost těla	0,41 [0,22; 0,61]	-0,32 [-0,51; -0,13]	-0,29 [-0,49; -0,09]	0,47 [0,27; 0,66]
Pohlaví M	0,07 [-0,09; 0,24]	-0,05 [-0,22; 0,13]	-0,17 [-0,33; -0,02]	0,13 [-0,03; 0,29]
Insektivorie	-0,07 [-0,73; 0,55]	-0,12 [-0,75; 0,52]	0,55 [-0,17; 1,23]	-0,26 [-0,96; 0,36]
Nektari/frugivorie	0,30 [-0,50; 1,11]	-0,59 [-1,39; 0,31]	1,51 [0,69; 2,36]	-0,29 [-1,18; 0,46]
Omnivorie	0,47 [-0,23; 1,19]	-0,69 [-1,38; 0,00]	1,05 [0,33; 1,81]	-0,05 [-0,75; 0,65]
Druhově specifická elevace	0,13 [-0,10; 0,36]	-0,18 [-0,43; 0,05]	0,11 [-0,12; 0,35]	0,11 [-0,12; 0,35]
Elevace odchyty	-0,25 [-0,46; -0,06]	0,25 [0,05; 0,46]	0,04 [-0,15; 0,23]	-0,25 [-0,44; -0,05]
Období rozmnožování	-0,08 [-0,44; 0,28]	-0,08 [-0,46; 0,29]	0,15 [-0,19; 0,50]	-0,03 [-0,39; 0,33]

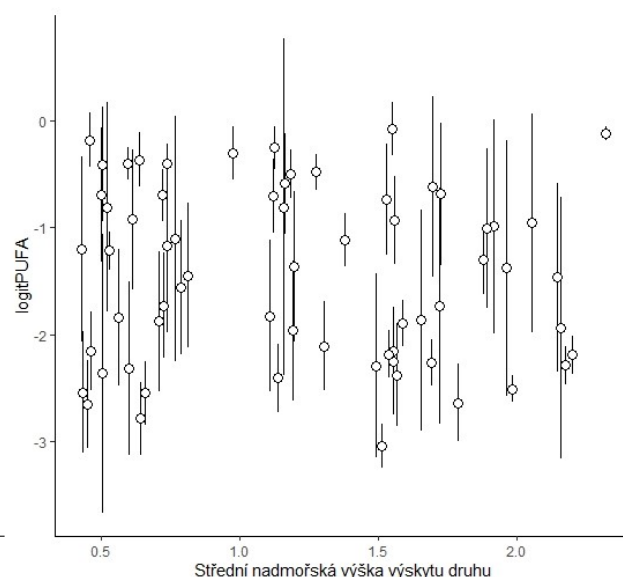
Tabulka 9. Model vlivu elevace na nenasycenost MK ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Tučně zvýrazněné jsou koeficienty, jejichž 95% intervaly kredibility nezahrnují nulu. $N_{\text{jedinců}} = 244$, $N_{\text{druhů}} = 72$. U všech modelů bylo $ESS \geq 1661$ a $\hat{R} < 1,01$.



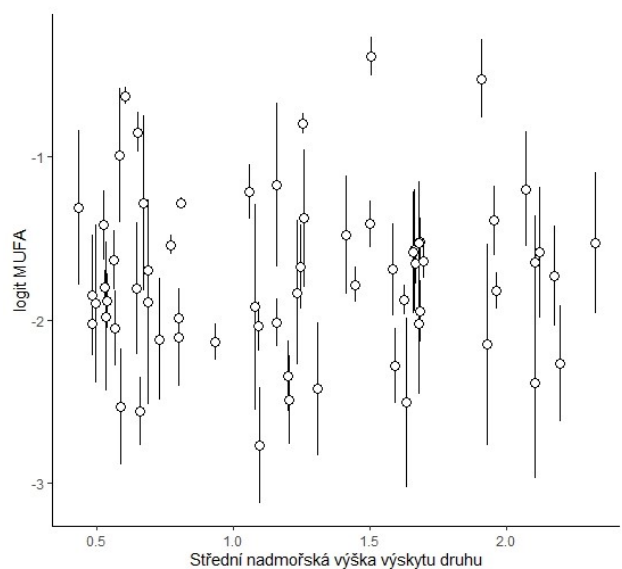
Graf 5. Vliv druhově specifické střední nadmořské výšky na nenasycenost MK ve fosfolipidech červených krvinek. Znázorněny jsou posteriorní odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility. Pozitivní koeficienty znamenají vyšší hodnoty indexů u ptačích druhů ve vyšších nadmořských výškách.



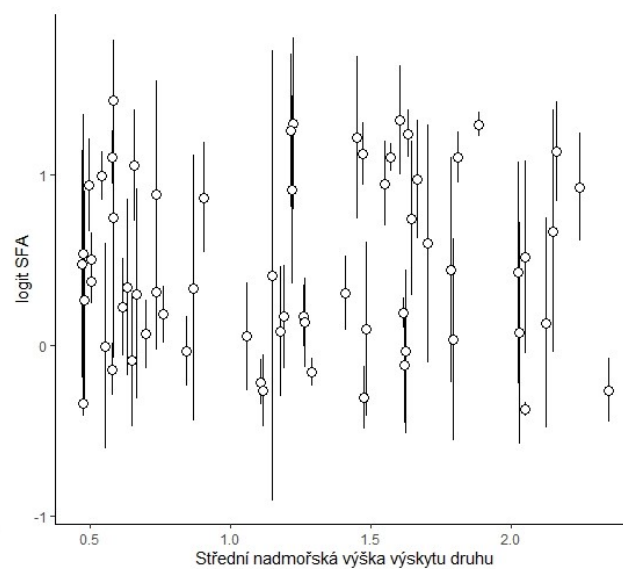
Graf 6.



Graf 7.



Graf 8.



Graf 9.

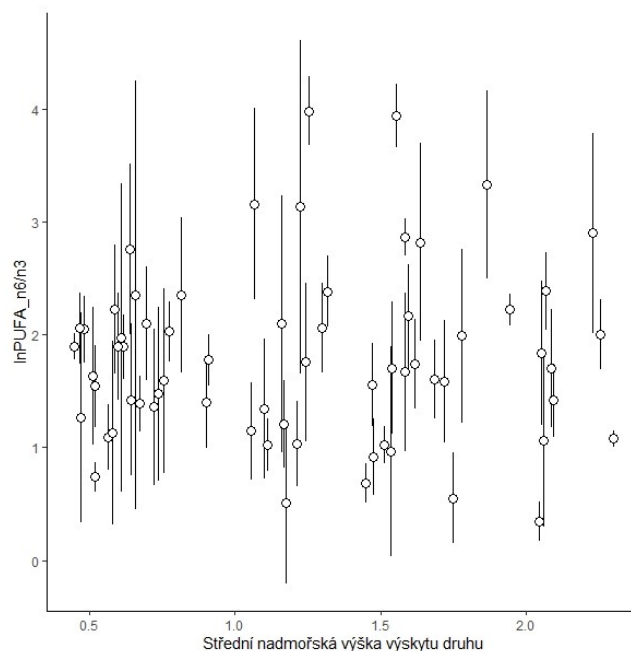
Grafy 6. – 9. Vliv střední nadmořské výšky výskytu druhu na nenasycenost MK ve fosfolipidech červených krvinek (DBI – Graf 6., obsah PUFA – Graf 7., obsah MUFA – Graf 8., obsah SFA – Graf 9). Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro membránové indexy a střední nadmořská výška výskytu druhu (km). Grafy znázorňují druhové průměry a jejich 95% konfidenční intervaly. Modely nevykazovaly signifikantní závislosti.

8.7 Vliv nadmořské výšky na poměr n6/n3 PUFA

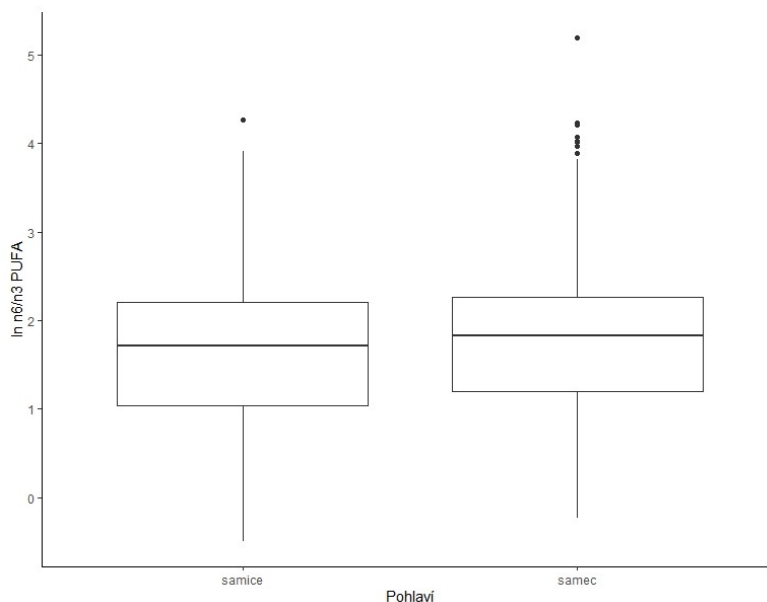
Nadmořská výška neměla podle našich výsledků na poměr n6/n3 PUFA v membránových MK vliv (Tabulka 10, Graf 10). Intervaly kredibility u korelace s velikostí těla a vlivu pohlaví (Graf 11) zahrnovaly nulu, ale posteriorní pravděpodobnost byla u obou vyšší než 95 %. Signifikantní závislost jsme ale našli pro vliv potravních strategií, u kterých byl pozorován vyšší poměr n6/n3 PUFA u herbivorů (Graf S11) ve srovnání s ostatními strategiemi. Vliv období rozmnožování opět pozorován nebyl.

n6/n3 PUFA	Koeficient	l-95% CI	u-95% CI
Intercept	1,05	-0,06	2,03
Velikost těla	-0,16	-0,33	0,02
Pohlaví M	0,17	-0,005	0,36
Insektivorie	-1,36	-1,99	-0,69
Nektari/frugivorie	-1,49	-2,29	-0,66
Omnivorie	-1,29	-1,90	-0,70
Druhově specifická elevace	-0,16	-0,38	0,06
Elevace odchyty	0,02	-0,18	0,23
Období rozmnožování	-0,10	-0,44	0,24

Tabulka 10. Model vlivu elevace na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Tučně zvýrazněné jsou koeficienty, jejichž 95% intervaly kredibility nezahrnují nulu. $N_{\text{jedinců}} = 244$, $N_{\text{druhů}} = 72$ druhů. U všech výsledků je $ESS \geq 1755$ a $\hat{R} < 1,01$.



Graf 10. Vliv střední nadmořské výšky výskytu druhu na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro poměr n6/n3 PUFA a střední nadmořská výška výskytu druhu (km). Graf znázorňuje druhové průměry a jejich 95% konfidenční intervaly. Model nevykazoval signifikantní závislost.



Graf 11. Vliv pohlaví na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro poměr n6/n3 PUFA znázorňující vyšší poměr u samců. $N_{\text{samec}} = 135$, $N_{\text{samice}} = 109$.

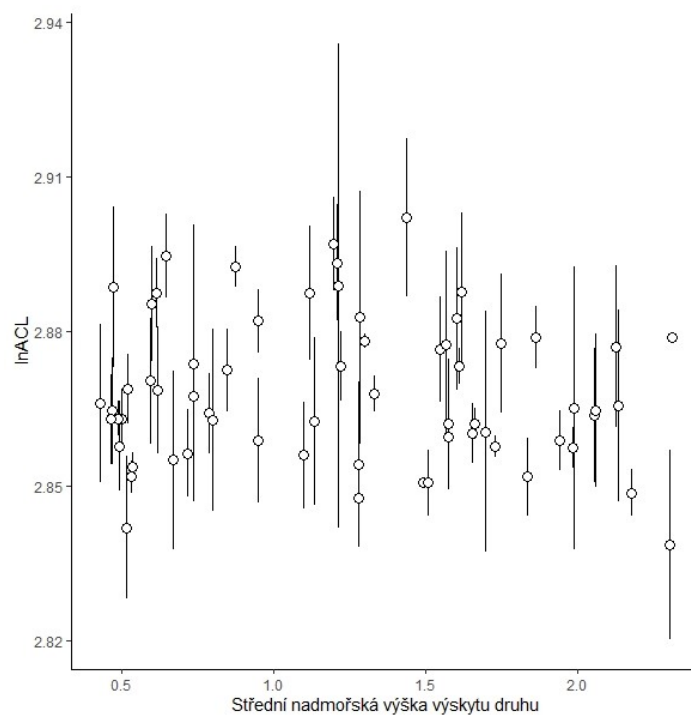
8.8 Vliv nadmořské výšky na délku řetězce MK

Výsledky modelu (Tabulka 11) ukázaly signifikantně pozitivní vztah mezi velikostí těla a průměrnou délkou řetězce (ACL), stejně jako vyšší ACL u samčích jedinců (Graf 13). Souvislost mezi druhově specifickou nadmořskou výškou a ACL u tropických druhů nalezena (Graf 12). Naopak byl pozorován dobře podpořený negativní vztah mezi ACL a nadmořskou výškou odchyty jedinců, který by stejně jako u modelu vlivu nadmořské výšky a nenasycenosti membrán naznačoval elevační vnitrodruhovou plasticitu.

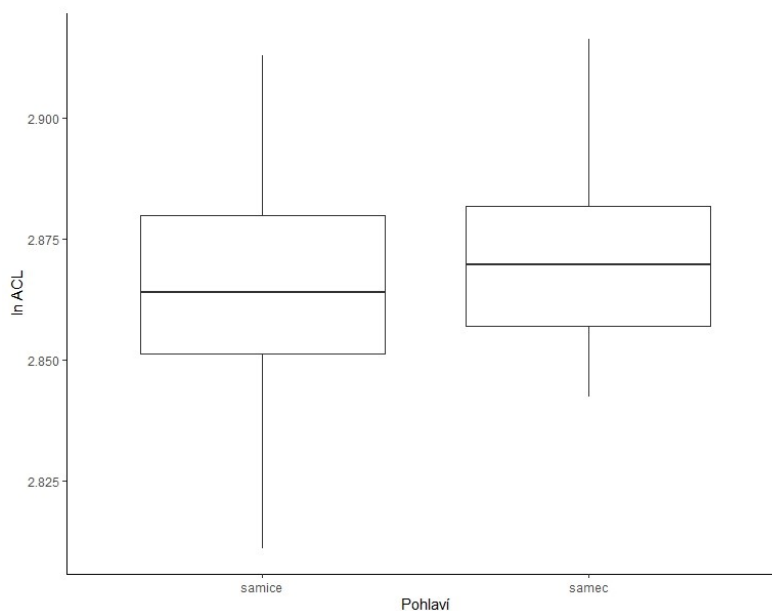
Vliv potravních strategií (Graf S12) nebo období rozmnožování na délku řetězce MK zaznamenaný nebyl.

ACL	Koeficient	l-95% CI	u-95% CI
Intercept	-0,13	-1,38	1,23
Velikost těla	0,30	0,10	0,51
Pohlaví M	0,22	0,05	0,39
Insektivorie	0,07	-0,67	0,82
Nektari/frugivorie	-0,05	-0,96	0,85
Omnivorie	0,28	-0,47	0,99
Druhově specifická elevace	0,15	-0,10	0,42
Elevace odchyty	-0,31	-0,52	-0,10
Období rozmnožování	0,07	-0,29	0,43

Tabulka 11. Model vlivu elevace na délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek. Uvedeny jsou koeficienty z modelu s kontinuálními proměnnými standardizovanými pomocí z-transformace a udávají tedy velikost účinku ve směrodatných odchylkách. Tučně zvýrazněné jsou koeficienty, jejichž 95% intervaly kredibility nezahrnují nulu. $N_{\text{jedinců}} = 244$, $N_{\text{druhů}} = 72$ druhů. U všech výsledků je $ESS \geq 1895$ a $\hat{R} < 1,01$.



Graf 12. Vliv střední nadmořské výšky výskytu druhu na průměrnou délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro ACL a střední nadmořská výška výskytu druhu (km). Graf znázorňuje druhové průměry a jejich 95% konfidenční intervaly. Model nevykazoval signifikantní závislost.



Graf 13. Vliv pohlaví na poměr průměrnou délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek. Zobrazena jsou nestandardizovaná, logaritmovaná data pro ACL znázorňující vyšší obsah MK s delším řetězcem u samců. $N_{\text{samec}} = 135$, $N_{\text{samice}} = 109$.

9. DISKUZE

Existují hypotézy uvažující o složení membrán jako o zásadním fyziologickém znaku zodpovědném za různou délku života a intenzitu metabolismu živočichů. Jednou z nich je pacemakerová hypotéza předpokládající vyšší nenasycenost membrán, tedy vyšší DBI a vyšší obsah PUFA u živočichů s kratší délkou života a rychlejším metabolismem (Hulbert, 2005). Alternativní hypotéza (antioxidační hypotéza) predikuje přesně opačný efekt, a to vyšší nenasycenost membrán, zejména vyšší obsah PUFA u druhů s delším životem. Tato hypotéza je založená na předpokladu, že by PUFA mohly v membránách fungovat jako strukturní antioxidanty (Schmid-Siegert et al., 2016). Další hypotézy předpokládají, že pro délku života a rychlost metabolismu může být důležitější poměr $n6/n3$ PUFA (Valencak and Ruf, 2007; Valencak and Azzu, 2014) nebo délka řetězce MK (Jové et al., 2013; Galván et al., 2015). Délka života a intenzita metabolismu jsou stejně jako další life-history znaky určující výsledné životní strategie silně korelovány s velikostí těla živočichů. Dále jsme podle našich predikcí očekávali, že tropičtí a temperátní druhy ptáků lišící se životními strategiemi budou nezávisle na velikosti těla vykazovat rozdílné složení membrán. Spolu s vyššími termoregulačními nároky a pozorovanou vyšší intenzitou metabolismu ve vyšších nadmořských výškách (Hayes, 1989; Weathers et al., 2002; Lindsay et al., 2009; Hille and Cooper, 2015; Boyle et al., 2016; Balasubramaniam and Rotenberry, 2016; Storz et al., 2019) jsme dále predikovali, že se složení membrán může lišit i v závislosti na nadmořské výšce.

Nejprve jsme testovali opakovatelnost všech membránových indexů v rámci druhu a jestli lze variabilitu těchto indexů vysvětlit fylogenezí. Z výsledků vyplývá, že testované indexy jsou druhově specifické a mohou tedy podléhat selekci. Výsledky dále ukázaly, že variabilitu ve složení membrán lze do určité míry vysvětlit společnou evoluční historií. Pokud bychom tedy modely nekontrolovali na vliv fylogeneze, výsledky by byly touto společnou evoluční historií zkreslené.

Faktor, který je pro rychlost životních strategií zásadní je již zmíněná **velikost těla**. U téměř všech membránových indexů, testovaných jak v rámci latitudy, tak v rámci elevace, jsme zjistili velký vliv velikosti těla. Pozorovali jsme pozitivní korelaci na nenasycenost MK, tedy na obsah DBI a PUFA a naopak negativní korelaci pro SFA a u tropických druhů též pro obsah

MUFA. Žádné korelační tendence s velikostí těla jsme ale nezaznamenali pro obsah MUFA v latitudinálním gradientu, tedy pro pěvce tropů a temperátů. Signifikantní negativní korelaci jsme našli s poměrem $n6/n3$ PUFA a pozitivně s délkou řetězce MK. Některé studie nachází vztahy mezi různými life-history znaky a životními strategiemi, ale výsledné korelace mohou být pouze artefaktem právě společného vlivu velikosti těla, který je téměř všudypřítomný (Jové et al., 2013). Například při studiu hmotnostně specifické intenzity metabolismu a délky života, dle předpokladů Rate-of-living teorie (Pearl, 1928) některé studie nacházely negativní korelace (Symonds, 1999; Duarte and Speakman, 2014; Healy et al., 2014). Pokud ale bylo kontrolováno i na vliv velikosti těla, žádná závislost již pozorována nebyla (de Magalhães et al., 2007; Furness and Speakman, 2008; Stark et al., 2020).

Výsledky vlivu zeměpisné šířky na **nenasycenost membrán** naznačují, že nížinné tropické druhy pěvců disponují, i po odfiltrování vlivu fylogeneze a hmotnosti, signifikantně vyšším obsahem PUFA a sníženým obsahem MUFA ve fosfolipidech červených krvinek, oproti druhům temperátním. Tyto korelace se projeví i v tendenci k celkově vyšší nenасыcenosti membrán. Vyšší nenасыcenost membránových MK u větších a tropických druhů indikují, že u druhů s pomalými životními strategiemi je selektována vyšší nenасыcenost membrán. Takové výsledky jsou v souladu s predikcemi, které vychází z hypotézy pokládající vyšší polynenasycenost za důležitý antioxidační mechanismus membrán (Schmid-Siebert et al., 2016) a nepodporují Pacemakerovou teorii (Hulbert, 2005). Hypotéza membrán jako strukturních antioxidantů by mohla vysvětlovat, proč mají tropické druhy membrány s více polynenasycenými MK, i přesto že jsou jejich životní strategie ve srovnání s temperátními druhy pomalejší. Dalším vysvětlením těchto korelací a též námi pozorované tendence k nižšímu obsahu SFA u délejižících tropických druhů by mohlo být, že saturované a méně nenасыcené MK jsou díky absenci, či nízkému počtu dvojných vazeb lépe a rychleji využitelné pro energetický metabolismus, a proto je jejich vyšší obsah výhodnější pro druhy s rychlejším metabolismem a životním tempem (Bozek et al., 2017). Tento předpoklad však vznikl při studiu triacylglycerolů, zatímco my jsme se věnovali membránovým fosfolipidům, které nemusí být pro energetický metabolismus příliš významné. Galván et al. (2015) nachází v rámci jaterních lipidů také vyšší nenасыcenost u déle žijících ptáků, za které my považujeme tropické druhy, ale v jejich studii je naopak způsobena vyšším obsahem

MUFA, neboť výsledný obsah PUFA s délkou života klesá, stejně jako obsah SFA. Mechanismus zodpovědný za vyšší nenasycenost (PUFA X MUFA) u déle žijících druhů by tedy mohl být odlišný v závislosti na ekologických podmínkách, neboť výsledky studie Galván et al. (2015) pochází pouze z temperátní oblasti.

Ve výsledcích našich korelačních analýz jsme u druhově specifické nadmořské výšky žádné trendy s nenasyceností membrán nepozorovali. Zdá se tedy, že nížinné a horské druhy se v tomto znaku mezi sebou minimálně v rámci tropů neliší. Tento výsledek tedy opět nepodporuje pacemakerovou hypotézu. Výsledky signifikantních změn nenasycenosti jsme našli pouze v souvislosti s nadmořskou výškou odchyty jedinců, a to nižší míru nenasycenosti (DBI) ve vyšších polohách, opět související s nižším zastoupením PUFA a vyšším obsahem SFA. Obsah MUFA se ale s odchytovou nadmořskou výškou neměnil. Tyto výsledky by podporovaly hypotézu, že pro rychlejší metabolismus by mohly být výhodnější více nasycené MK (SFA) umožňující rychlejší produkci energie (Bozek et al., 2017). Náš výsledek by spolu s hypotézou strukturních antioxidantů naznačoval, že ve vyšších nadmořských výškách je nižší potřeba antioxidační ochrany, ale proč by tomu tak mohlo být není jasné.

Korelační tendence, které jsme sledovali u membránových indexů s velikostí těla, nalézáme s inverzní závislostí i se zeměpisnou šířkou a nadmořskou výškou. Výjimkou je ale obsah MUFA, pro který jsme v případě latitudy pozorovali vliv tropického prostředí, ale žádnou korelaci s velikostí těla. Naopak v elevačním modelu jsme souvislost MUFA s nadmořskou výškou nenašli, ale signifikantní vztah s velikostí těla ano. Nezbytností tedy bylo naše modely kontrolovat právě na vliv hmotnosti, ale nenalezené korelace obsahu membránových MUFA s velikostí těla či nadmořskou výškou napovídají, že příčiny jejich změn nemusí být stejné a spojené s životními strategiemi.

Z výsledků dále plyne, že ani zeměpisná šířka ani druhově specifická nebo odchytová nadmořská výška nemají vliv na **poměr n6/n3 PUFA** v membránách, který někteří považují za důležitý pro délku života a životní strategie (Valencak and Ruf, 2007; Valencak and Azzu, 2014). Naše pozorování ale naznačuje, že poměr n6/n3 PUFA nemusí s intenzitou metabolismu ani s životními strategiemi souviset.

Částečnou podporu jsme našli pro význam zeměpisné šířky na **délku řetězce MK**. Pozorovali jsme hraničně nesignifikantní trend vyšší průměrné délky řetězce u tropických druhů. Tuto korelaci jsme na základě předešlé studie jaterních lipidů ptáků nacházející vyšší průměrnou délkou řetězce u déle žijících druhů (Galván et al., 2015) předpokládali. Mechanismus zodpovědný za tuto souvislost není zatím objasněn, ale výhodnost MK s dlouhým řetězcem i spolu s membránovou nenasyceností by moha spočívat ve strukturních změnách membrány spojených s vyšší odolností proti lipidové peroxidaci (Galván et al., 2015). I podle našich výsledků lze tedy spekulovat o souvislosti mezi dlouhými MK a dlouhověkostí. Další práci studující délku řetězce MK a délku života (Jové et al., 2013) nacházející opačný trend nepovažujeme při studiu membrán za příliš relevantní, neboť se věnovala celkovému obsahu volných MK v plazmě, které jsou úzce spojené s energetickým metabolismem, a není jasné, jakou souvislost mají se složením membrán. V případě vlivu druhově specifické nadmořské výšky na délku řetězce MK jsme žádné souvislosti nepozorovali. Naproti tomu mezi průměrnou délkou řetězce MK a nadmořskou výškou odchytu jsme našli signifikantní negativní vztah, který by mohl spolu s pozorovanou nižší nenasyceností ve vyšších polohách, naznačovat nižší odolnost membrán ve vyšších nadmořských výškách a s tím spojenou kratší délku života.

Při sledování vlivu **pohlaví** na membránové indexy jsme v obou modelech u samců zjistili nižší obsah MUFA, zatímco nižší DBI pouze v modelu latitudy. Naopak vyšší délku řetězce MK u samců jsme pozorovali pouze v elevačním modelu. V rámci tropických i temperátních druhů pěvců jsme také našli signifikantně vyšší poměr $n6/n3$ PUFA u samců. Některé další studie ukazují, že membránový obsah různých PUFA se mění jak v závislosti na druhu tkáně, tak na pohlaví (Grant et al., 2008). V rámci plazmatických fosfolipidů byl například také nalezen vyšší obsah SFA a MUFA u žen (Decsi and Kennedy, 2011). Různý obsah membránových MK by mohl souviset s pohlavně odlišnými fyziologickými potřebami na latitudinálním i elevačním gradientu, ale také s hormonálními rozdíly mezi pohlavími, které pravděpodobně mohou ovlivňovat složení membrán a mnoho metabolických aktivit v těle (Gonzalez et al., 1986; Marra and de Alaniz, 1989; Lohner et al., 2013).

Dále jsme u některých membránových indexů zaznamenali korelace s **potravními strategiemi**. Doposud nemáme příliš mnoho poznatků o vlivu potravy na složení membrán.

Zatímco někteří autoři se domnívali, že potrava vliv na složení membrán má (Escudero et al., 1998; Faulks et al., 2006; Valencak and Ruf, 2011), dle Abbott et al. (2012) má potrava vliv spíše na složení tukové tkáně a plazmatické triacylglyceroly, než na složení membrán, a to za podmínky, že strava obsahuje vysoké procento n3 PUFA oproti normálnímu příjmu PUFA. Velmi výrazné změny jsme ale pozorovali v případě obsahu MUFA v rámci nektari/frugivorní potravy, oproti jiným strategiím. Možným vysvětlením je, že by například některé ovocné plody mohly obsahovat více MUFA (Malainey et al., 1999). U nektarivorních jedinců je ale také zaznamenána konzumace hmyzu kvůli nedostatku látek jako je dusík nebo proteiny (van Tets and Nicolson, 2000), přesné složení potravy a původ této korelace můžeme jen odhadovat. Faulks et al. (2006) nachází změny fosfolipidového složení různých tkání i poměru n6/n3 PUFA způsobené různým kalorickým příjmem. V našich výsledcích jsme též našli rozdíly v poměru n6/n3 PUFA, a to vyšší poměr u herbivorů. V našem případě ale nebylo v některých potravních kategoriích příliš mnoho testovaných druhů, proto mohou být některé korelace pouze výsledkem náhody. Pro zjišťování signifikancí v rámci vlivu potravy na složení buněčných membrán by bylo potřeba zahrnout vyšší počet druhů a jedinců pro všechny potravní strategie.

V rámci analýz nebyly nalezeny žádné změny membránových indexů v souvislosti s tím, zda byly vzorky odebrány v období rozmnožování, či nikoliv. Zahrnutá migrační vzdálenost s membránovými indexy také nekorelovala. Zdá se tedy, že složení lipidových membrán krvinek není adaptace důležitá pro migrační chování. Nelze však vyloučit, že jiné tkáně, například svaly, souvislost mezi složením membrán a migračním chováním nevykazují.

10. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

Cílem této práce založené na komparativní analýze více než 80 druhů pěvců bylo porovnat složení buněčných membrán v závislosti na rozdílné intenzitě metabolismu a životních strategiích, které pozorujeme jak v různých zeměpisných šířkách, tak v rámci gradientu nadmořské výšky. Z výsledků je patrný velký vliv velikosti těla na většinu membránových indexů. Nalezený vyšší obsah vysoce nenasycených MK v membránách tropických druhů pěvců, u kterých je pozorovaná vyšší délka života by mohl podporovat hypotézu, že polynenasycené MK mohou mít v membránách antioxidační účinky.

Nezaznamenali jsme ale souvislost mezi membránovými indexy a nadmořskou výškou specifickou pro jednotlivé druhy. Naopak na úrovni jedinců jsme našli signifikantní korelace, které jsou opět v souladu s hypotézou předpokládající antioxidační účinky nenasycenosti. Pozorovanou vyšší membránovou nasyceností ve vyšších nadmořských výškách, ve kterých lze nalézt také vyšší intenzitu metabolismu, jsme též podpořili úvahu, že nasycené mastné kyseliny mohou být výhodnější z hlediska jejich snazšího využití pro energetickou konverzi. V žádném z našich výsledků jsme nepozorovali podporu pro pacemakerovou hypotézu. Tyto výsledky by nasvědčovaly, že rozdíly ve složení membrán nejsou evoluční adaptací související s nadmořskou výškou, ale mohla by za ně být zodpovědná vnitrodruhová plasticita. Další studie by se v rámci gradientu nadmořských výšek mohly zaměřit spíše na detailní studium pozorovaných vnitrodruhových rozdílů.

11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Sekundární zdroje označeny *

Abbott, S.K., Else, P.L., Atkins, T.A., and Hulbert, A.J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 1309–1317.

Ashmole, N.P. (1963). The Regulation of Numbers of Tropical Oceanic Birds. *Ibis* 103b, 458–473.

Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.

Badyaev, A.V. (1997). Avian life history variation along altitudinal gradients: an example with cardueline finches. *Oecologia* 111, 365–374.

Badyaev, A., and Ghalambor, C. (2001). Evolution of Life Histories along Elevational Gradients: Trade-Off between Parental Care and Fecundity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 82, 2948–2960.

Balasubramaniam, P., and Rotenberry, J.T. (2016). Elevation and latitude interact to drive life-history variation in precocial birds: a comparative analysis using galliformes. *Journal of Animal Ecology* 85, 1528–1539.

Bantock, T.M., Prys-Jones, R.P., and Lee, P.L.M. (2008). New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources* 8, 519–528.

Barja, G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production–DNA damage mechanism? *Biological Reviews* 79, 235–251.

Bears, H., Martin, K., and White, G. (2009). Breeding in high-elevation habitat results in shift to slower life-history strategy within a single species. *The Journal of Animal Ecology* 78, 365–375.

Bech, C., Chappell, M.A., Astheimer, L.B., Londoño, G.A., and Buttemer, W.A. (2016). A ‘slow pace of life’ in Australian old-endemic passerine birds is not accompanied by low basal metabolic rates. *J Comp Physiol B* 186, 503–512.

Bielski, B.H.J., Arudi, R.L., and Sutherland, M. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 4759–4761.

Bohning-Gaese, K., Halbe, B., Lemoine, N., and Oberrath, R. (2000). Factors influencing the clutch size, number of broods and annual fecundity of North American and European land birds. *EVOLUTIONARY ECOLOGY RESEARCH* 2, 823–839.

Boyce, A.J., Freeman, B.G., Mitchell, A.E., and Martin, T.E. (2015). Clutch size declines with elevation in tropical birds. *The Auk* 132, 424432.

- Boyce, A.J., Mouton, J.C., Lloyd, P., Wolf, B.O., and Martin, T.E. (2020). Metabolic rate is negatively linked to adult survival but does not explain latitudinal differences in songbirds. *Ecology Letters* 23, 642–652.
- Boyle, W.A., Sandercock, B.K., and Martin, K. (2016). Patterns and drivers of intraspecific variation in avian life history along elevational gradients: a meta-analysis. *Biological Reviews* 91, 469–482.
- Bozek, K., Khrameeva, E.E., Reznick, J., Omerbašić, D., Bennett, N.C., Lewin, G.R., Azpurua, J., Gorbunova, V., Seluanov, A., Regnard, P., et al. (2017). Lipidome determinants of maximal lifespan in mammals. *Scientific Reports* 7, 1–10.
- Brandon, R.N. (1990). *Adaptation and Environment* (Princeton, NJ: Princeton University Press).*
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., and West, G.B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771–1789.
- Brzek, P., Bielawska, K., Ksiazek, A., and Konarzewski, M. (2007). Anatomic and molecular correlates of divergent selection for basal metabolic rate in laboratory mice. *Physiological and Biochemical Zoology* : PBZ 80, 491–499.
- Bürkner, P.-C. (2017). brms: An R package for bayesian multilevel models using Stan. *Journal of Statistical Software* 80, 1–28.
- Bushuev, A., Tolstenkov, O., Zubkova, E., Solovyeva, E., and Kerimov, A. (2018). Basal metabolic rate in free-living tropical birds: the influence of phylogenetic, behavioral, and ecological factors. *Curr Zool* 64, 33–43.
- Butler, P.J., Green, J., Boyd, I., and Speakman, J. (2004). Measuring metabolic rate in the field: The pros and cons of the doubly labelled water and heart rate methods. *Functional Ecology* 18, 168–183.
- Calder, P.C. (2003). N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids* 38, 343–352.
- Cody, M.L. (1966). A General Theory of Clutch Size. *Evolution* 20, 174–184.
- Cooper, C., Hochachka, W., Butcher, G., and Dhondt, A. (2005). Seasonal and latitudinal trends in clutch size: Thermal constraints during laying and incubation. *Ecology* 86, 2018–2031.
- Couture, P., and Hulbert, A.J. (1995). Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J. Membr. Biol.* 148, 27–39.
- Darwin, C.R. (1869). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life* (London: John Murray).
- Decsi, T., and Kennedy, K. (2011). Sex-specific differences in essential fatty acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 94, 1914S–1919S.

- Dillon, K., and Conway, C. (2015). Elevational gradient in clutch size of Red-faced Warblers: Elevational Gradient in Clutch Size. *Journal of Field Ornithology* 86.
- Dillon, K.G., and Conway, C.J. (2018). Nest predation risk explains variation in avian clutch size. *Behav Ecol* 29, 301–311.
- Duarte, L.C., and Speakman, J.R. (2014). Low resting metabolic rate is associated with greater lifespan because of a confounding effect of body fatness. *Age (Dordr)* 36.
- Dunn, P., Thusius, K., and Winkler, D. (2009). Geographic and ecological variation in clutch size of Tree Swallows. *The Auk* 117, 215–221.
- Escudero, A., Montilla, J.C., García, J.M., Sánchez-Quevedo, M.C., Periago, J.L., Hortelano, P., and Suárez, M.D. (1998). Effect of dietary (n–9), (n–6) and (n–3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1394, 65–73.
- Fair, J.M., and Jones, J. (2010). Guidelines to the use of wild birds in research (Washington: Ornithological Council).
- Faulks, S.C., Turner, N., Else, P.L., and Hulbert, A.J. (2006). Calorie restriction in mice: effects on body composition, daily activity, metabolic rate, mitochondrial reactive oxygen species production, and membrane fatty acid composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 781–794.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 248–253.*
- Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Bolker, B., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., et al. (2020). car: Companion to Applied Regression.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875–880.*
- Furness, L.J., and Speakman, J.R. (2008). Energetics and longevity in birds. *Age (Dordr)* 30, 75–87.
- Galván, I., Naudí, A., Erritzøe, J., Møller, A.P., Barja, G., and Pamplona, R. (2015). Long lifespans have evolved with long and monounsaturated fatty acids in birds. *Evolution* 69, 2776–2784.
- Ghalambor, C.K., and Martin, T.E. (2001). Fecundity-survival trade-offs and parental risk-taking in birds. *Science* 292, 494–497.
- Gonzalez, S., Nervi, A.M., and Peluffo, R.O. (1986). Effects of estradiol and environmental temperature changes on rat liver delta 6 microsomal desaturase activity. *Lipids* 21, 440–443.
- Grant, R., Lees, S., Legg, G., and Burdge, G. (2008). Gender differences in the PUFA-fatty acid composition of membrane phospholipids in rats. *Proceedings of the Nutrition Society* 67.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., and Dawson, R.J.G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1071–1075.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Arcemis, C.J., and Catalá, A. (2000). Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 73–79.

Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Mosca, S.M., and Catalá, A. (2006). A low degree of fatty acid unsaturation leads to high resistance to lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of different organs of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Mol Cell Biochem* 282, 109–115.

Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., et al. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763–1768.

Haldane, J.B.S. (1932). *The causes of evolution* (New York: Longmans, Green & Co, Ltd).

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.

Harvey, P.H., Pagel, M.D., and Rees, J.A. (1991). Mammalian metabolism and life histories. *The American Naturalist* 137, 556–566.

Hayes, J.P. (1989). Field and maximal metabolic rates of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) at low and high altitudes. *Physiological Zoology* 62, 732–744.

Healy, K., Guillerme, T., Finlay, S., Kane, A., Kelly, S., Mcclean, D., Kelly, D., Donohue, I., Jackson, A., and Cooper, N. (2014). Ecology and mode-of-life explain lifespan variation in birds and mammals. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 281, 20140298.

Heij, M.E. de, Graaf, A.J. van der, Hafner, D., and Tinbergen, J.M. (2007). Metabolic rate of nocturnal incubation in female great tits, *Parus major*, in relation to clutch size measured in a natural environment. *Journal of Experimental Biology* 210, 2006–2012.

Hille, S.M., and Cooper, C.B. (2015). Elevational trends in life histories: revising the pace-of-life framework. *Biological Reviews* 90, 204–213.

Holman, R.T. (1954). Autoxidation of fats and related substances. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 2, 51–98.

del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A., and Kirwan, G. (2020). *Handbook of the birds of the world Alive*. Barcelona, Spain: Lynx Edicions

Hulbert, A. (2005). On the importance of FA composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology* 234, 277–288.

Hulbert, A.J. (2014). A Sceptics View: “Kleiber’s Law” or the “3/4 Rule” is neither a Law nor a Rule but Rather an Empirical Approximation. *Systems* 2, 186–202.*

Hulbert, A.J., and Else, P.L. (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of Theoretical Biology* 199, 257–274.

- Hulbert, A., Faulks, S., Harper, J., Miller, R., and Buffenstein, R. (2006a). Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 653–657.
- Hulbert, A.J., Faulks, S.C., and Buffenstein, R. (2006b). Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 1009–1018.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R., and Buttemer, W.A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews* 87, 1175–1213.
- Jetz, W., Sekercioglu, C.H., and Boehning-Gaese, K. (2008). The worldwide variation in avian clutch size across species and space. *PLoS. Biol.* 6, 2650–2657.
- Jetz, W., Thomas, G.H., Joy, J.B., Hartmann, K., and Mooers, A.O. (2012). The global diversity of birds in space and time. *Nature* 491, 444.
- Jimenez, A.G., and Williams, J.B. (2014). Differences in muscle fiber size and associated energetic costs in phylogenetically paired tropical and temperate birds. *Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches* 87, 752–761.
- Jimenez, A.G., Brocklyn, J.V., Wortman, M., and Williams, J.B. (2014). Cellular metabolic rate is influenced by life-history traits in tropical and temperate birds. *PLOS ONE* 9, e87349.
- Johnston, J.P., Peach, W., Gregory, R., and White, S.A. (1998). Survival rates of tropical and temperate passerines: a Trinidadian perspective. *The American Naturalist* 150, 771–789.
- Jové, M., Naudí, A., Aledo, J., Cabré, R., Ayala, V., Portero-Otin, M., Barja, G., and Pamplona, R. (2013). Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Scientific Reports* 3, 3346.
- Koolman, J., and Roehm, K.H. (2005). *Color atlas of biochemistry* (Georg Thieme Verlag).*
- Lack, D. (1947). The significance of clutch-size. *Ibis* 89, 302–352.
- Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666, 62–87.
- Lindsay, C., Downs, C., and Brown, M. (2009). Physiological variation in Amethyst Sunbirds (*Chalcomitra amethystina*) over an altitudinal gradient in winter. *The Journal of Experimental Biology* 212, 483–493.
- Lohner, S., Fekete, K., Marosvölgyi, T., and Decsi, T. (2013). Gender Differences in the Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Status: Systematic Review of 51 Publications. *ANM* 62, 98–112.

- Londoño, G.A., Chappell, M.A., Castañeda, M. del R., Jankowski, J.E., and Robinson, S.K. (2015). Basal metabolism in tropical birds: latitude, altitude, and the ‘pace of life.’ *Functional Ecology* 29, 338–346.
- Lu, X., Yu, T., Liang, W., and Yang, C. (2010). Comparative breeding ecology of two White-bellied Redstart populations at different altitudes. *Journal of Field Ornithology* 81, 167–175.
- MacArthur, R.H., and Wilson, E.O. (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton University Press.
- de Magalhães, J.P., Costa, J., and Church, G.M. (2007). An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 149–160.
- Malainey, M.E., Przybylski, R., and Sherriff, B.L. (1999). The fatty acid composition of native food plants and animals of western Canada. *Journal of Archaeological Science* 26, 83–94.
- Marion-Letellier, R., Savoye, G., and Ghosh, S. (2015). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life* 67, 659–667.
- Marra, C.A., and de Alaniz, M.J. (1989). Influence of testosterone administration on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in male and female rats. *Lipids* 24, 1014–1019.
- Martin, T.E. (1996). Life history evolution in tropical and south temperate birds: what do we really know? *Journal of Avian Biology* 27, 263–272.
- Martin, M., Camfield, A.F., and Martin, K. (2009). Demography of an alpine population of Savannah Sparrows. *Journal of Field Ornithology* 80, 253–264.
- Martin, T.E., Martin, P.R., Olson, C.R., Heidinger, B.J., and Fontaine, J.J. (2000). Parental care and clutch sizes in North and South American birds. *Science* 287, 1482–1485.
- Martin, T.E., Riordan, M.M., Repin, R., Mouton, J.C., and Blake, W.M. (2017). Apparent annual survival estimates of tropical songbirds better reflect life history variation when based on intensive field methods. *Global Ecology and Biogeography* 26, 1386–1397.
- Mcgregor, R., Whittingham, M., and CRESSWELL, W. (2007). Survival rates of tropical birds in Nigeria, West Africa. *Ibis* 149, 615–618.
- Mcnab, B., Hulbert, R., Cordell, A., Miller, J., Page, L., Portell, R., Quitmyer, I., and Steadman, D. (2013). The ecological energetics of birds in New Guinea. *Bulletin, University of Florida Museum of Natural History* 52, 95–159.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., and Johnson, J.E. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology* 15, 575–591.
- Montgomery, M.K., Hulbert, A.J., and Buttemer, W.A. (2011). The long life of birds: the rat-pigeon comparison revisited. *PLOS ONE* 6, e24138.

- Moreau, R.E. (1944). Clutch-size: a comparative study, with special reference to African birds. *Ibis* 86, 286–347.
- Muñoz, A.P., Kéry, M., Martins, P.V., and Ferraz, G. (2018). Age effects on survival of Amazon forest birds and the latitudinal gradient in bird survival. *Tauk* 135, 299–313.
- Munshi-South, J., and Wilkinson, G.S. (2010). Bats and birds: Exceptional longevity despite high metabolic rates. *Ageing Research Reviews* 9, 12–19.
- Ogdens, E.L., MARTIN, M., and Martin, K. (2012). Mating and breeding success decline with elevation for the Pacific Wren (*Troglodytes pacificus*) in coastal mountain forests. *The Wilson Journal of Ornithology* 124, 270–276.
- Pagel, M. (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401, 877–884.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777, 1249–1262.
- Pamplona, R., Prat, J., Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López Torres, M., and Barja, G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mechanisms of Ageing and Development* 86, 53–66.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Herrero, A., and Barja, G. (1999a). A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* 106, 283–296.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ledo, F., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G. (1999b). Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clin Exp Res* 11, 44–49.
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development* 112, 169–183.
- Pamplona, R., Barja, G., and Portero-Otín, M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* 959, 475–490.
- Peach, W.J., Hanmer, D.B., and Oatley, T.B. (2001). Do southern African songbirds live longer than their European counterparts? *Oikos* 93, 235–249.
- Pearl, R. (1928). *The rate of living* (New York: Alfred A.Knopf Inc.).
- Pianka, E. (1970). R-Selection and K-Selection. *Am. Nat.* 104, 592–.

- Porter, R.K., Hulbert, A.J., and Brand, M.D. (1996). Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 271, R1550–R1560.
- Quintero, I., and Jetz, W. (2018). Global elevational diversity and diversification of birds. *Nature* 555, 246–250.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria).
- Read, A.F., and Harvey, P.H. (1989). Life history differences among the eutherian radiations. *Journal of Zoology* 219, 329–353.
- Réale, D., Garant, D., Humphries, M.M., Bergeron, P., Careau, V., and Montiglio, P.-O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 4051–4063.
- Reid, J.M., Monaghan, P., and Ruxton, G.D. (2000). The consequences of clutch size for incubation conditions and hatching success in starlings. *Functional Ecology* 14, 560–565.
- Ricklefs, R.E. (2000). Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. *Condor* 102, 9–22.
- Ricklefs, R.E., and Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 462–468.
- Rubner, M. (1908). *Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zu wachstum und ernährung* (Munich: Oldenberg).
- Sæther, B.-E. (1988). Pattern of covariation between life-history traits of European birds. *Nature* 331, 616–617.
- Sandercock, B.K., Martin, K., and Hannon, S.J. (2005). Life history strategies in extreme environments: comparative demography of Arctic and Alpine Ptarmigan. *Ecology* 86, 2176–2186.
- Sanz, J.J. (1998). Effects of geographic location and habitat on breeding parameters of Great Tits. *Auk* 115, 1034–1051.
- Sanz, J.J. (1999). Does daylength explain the latitudinal variation in clutch size of Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*? *Ibis* 141, 100–108.
- Schielke, C.K.M., Burda, H., Henning, Y., Okrouhlík, J., and Begall, S. (2017). Higher resting metabolic rate in long-lived breeding Ansell's mole-rats (*Fukomys anselli*). *Frontiers in Zoology* 14, 45.

- Schmid-Siebert, E., Stepushenko, O., Glauser, G., and Farmer, E.E. (2016). Membranes as structural antioxidants recycling of malondialdehyde to its source in oxidation-sensitive chloroplast fatty acids. *J. Biol. Chem.* 291, 13005–13013.
- Scholer, M.N., Merkord, C.L., Londoño, G.A., and Jankowski, J.E. (2018). Minimum longevity estimates for some Neotropical landbirds of southeastern Peru. *Wils* 130, 818–823.
- Schroeder, E.A., and Brunet, A. (2015). Lipid profiles and signals for long life. *Trends Endocrinol Metab* 26, 589–592.
- Scott, G.R. (2011). Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. *Journal of Experimental Biology* 214, 2455–2462.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Skutch, A.F. (1940). Some aspects of Central American bird-life: I. *The Scientific Monthly* 51, 409–418.
- Skutch, A.F. (1949). Do tropical birds rear as many young as they can nourish? *Ibis* 91, 430–455.
- Skutch, A.F. (1985). Clutch size, nesting success, and predation on nests of neotropical birds. *Ornithological Monographs* 575–594.
- Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Soobramoney, S., Downs, C., and Adams, N. (2003). Physiological variability in the Fiscal Shrike *Lanius collaris* along an altitudinal gradient in South Africa. *Journal of Thermal Biology* 28, 581–594.
- Speakman, J.R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology* 208, 1717–1730.
- Speakman, J.R., Talbot, D.A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J.S., Redman, P., Krol, E., Jackson, D.M., Johnson, M.S., and Brand, M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87–95.
- Stark, G., Pincheira-Donoso, D., and Meiri, S. (2020). No evidence for the ‘rate-of-living’ theory across the tetrapod tree of life. *Global Ecology and Biogeography* 29, 857–884.
- Stawski, C., Valencak, T.G., Ruf, T., Sadowska, E.T., Dheyongera, G., Rudolf, A., Maiti, U., and Koteja, P. (2015). Effect of selection for high activity-related metabolism on membrane phospholipid fatty acid composition in Bank Voles. *Physiological and Biochemical Zoology* 88, 668–679.

- Stearns, S.C. (1983). The influence of size and phylogeny on patterns of covariation among life-history traits in the mammals. *Oikos* 41, 173–187.
- Stearns, S.C. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* 3, 259–268.
- Stearns, S.C. (1992). The evolution of life histories.*
- Stoffel, M.A., Nakagawa, S., and Schielzeth, H. (2017). rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol* 8, 1639–1644.
- Stoleson, S., and Beissinger, S. (2002). Egg viability as a constraint on hatching synchrony at high ambient temperatures. *Journal of Animal Ecology* 68, 951–962.
- Storz, J.F., Cheviron, Z.A., McClelland, G.B., and Scott, G.R. (2019). Evolution of physiological performance capacities and environmental adaptation: insights from high-elevation deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Mammal* 100, 910–922.
- Stutchbury, B.J.M., and Morton, E.S. (2001). Behavioral ecology of tropical birds. (London: Academic Press).*
- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., and Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4.
- Symonds, M.R.E. (1999). Life histories of the Insectivora: the role of phylogeny, metabolism and sex differences. *Journal of Zoology* 249, 315–337.
- Synek, P., Popelková, A., Koubínová, D., Šťastný, K., Langrova, I., Votypka, J., and Munclinger, P. (2015). Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitology Research* 115.
- van Tets, I.G., and Nicolson, S.W. (2000). Pollen and the Nitrogen Requirements of the Lesser Double-collared Sunbird. *Auk* 117, 826–830.
- Tieleman, B.I. (2009). High and low, fast or slow: the complementary contributions of altitude and latitude to understand life-history variation. *Journal of Animal Ecology* 78, 293–295.
- Tieleman, B.I., Dijkstra, T.H., Lasky, J.R., Mauck, R.A., Visser, G.H., and Williams, J.B. (2006). Physiological and behavioural correlates of life-history variation: a comparison between tropical and temperate zone House Wrens. *Functional Ecology* 20, 491–499.
- Valcu, M., Dale, J., Griesser, M., Nakagawa, S., and Kempenaers, B. (2014). Global gradients of avian longevity support the classic evolutionary theory of ageing. *Ecography* 37, 930–938.
- Valencak, T., and Azzu, V. (2014). Making heads or tails of mitochondrial membranes in longevity and aging: A role for comparative studies. *Longevity & Healthspan* 3, 3.
- Valencak, T., and Ruf, T. (2013). Phospholipid composition and longevity: Lessons from Ames dwarf mice. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 35.

Valencak, T.G., and Ruf, T. (2007). N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell* 6, 15–25.

Valencak, T.G., and Ruf, T. (2011). Feeding into old age: long-term effects of dietary fatty acid supplementation on tissue composition and life span in mice. *Journal of Comparative Physiology B* 181, 289–298.

de Villemereuil, P., and Nakagawa, S. (2014). General quantitative genetic methods for comparative biology. In *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology*, (Heidelberg: Germany: Springer), pp. 287–303.

Weathers, W.W. (1979). Climatic adaptation in avian standard metabolic rate. *Oecologia* 42, 81–89.

Weathers, W., Davidson, C., Olson, C., Morton, M., Nur, N., and Famula, T. (2002). Altitudinal variation in parental energy expenditure by White-crowned Sparrows. *The Journal of Experimental Biology* 205, 2915–2924.

White, C.R., and Kearney, M.R. (2012). Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *J Comp Physiol B* 183, 1–26.

White, C.R., and Seymour, R.S. (2004). Does basal metabolic rate contain a useful signal? mammalian BMR allometry and correlations with a selection of physiological, ecological, and life-history variables. *Physiological and Biochemical Zoology* 77, 929–941.

Wiersma, P., Chappell, M.A., and Williams, J.B. (2007a). Cold- and exercise-induced peak metabolic rates in tropical birds. *PNAS* 104, 20866–20871.

Wiersma, P., Muñoz-Garcia, A., Walker, A., and Williams, J. (2007b). Tropical birds have slow pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9340–9345.

Wiersma, P., Nowak, B., and Williams, J.B. (2012). Small organ size contributes to the slow pace of life in tropical birds. *Journal of Experimental Biology* 215, 1662–1669.

Wikelski, M., Spinney, L., Schelsky, W., Scheuerlein, A., and Gwinner, E. (2003). Slow pace of life in tropical sedentary birds: a common-garden experiment on four stonechat populations from different latitudes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2383–2388.

Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11, 398–411.

Williams, G.C. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist* 100, 687–690.

Wilman, H., Belmaker, J., Simpson, J., Rosa, C. de la, Rivadeneira, M.M., and Jetz, W. (2014). EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. *Ecology* 95, 2027–2027.

Wilson, S., and Martin, K. (2011). Life-history and demographic variation in an alpine specialist at the latitudinal extremes of the range. *Population Ecology* 53, 459–471.

Wone, B.W.M., Donovan, E.R., Cushman, J.C., and Hayes, J.P. (2013). Metabolic rates associated with membrane fatty acids in mice selected for increased maximal metabolic rate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165, 70–78.

Yates, C.M., Calder, P.C., and Ed Rainger, G. (2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics* 141, 272–282.

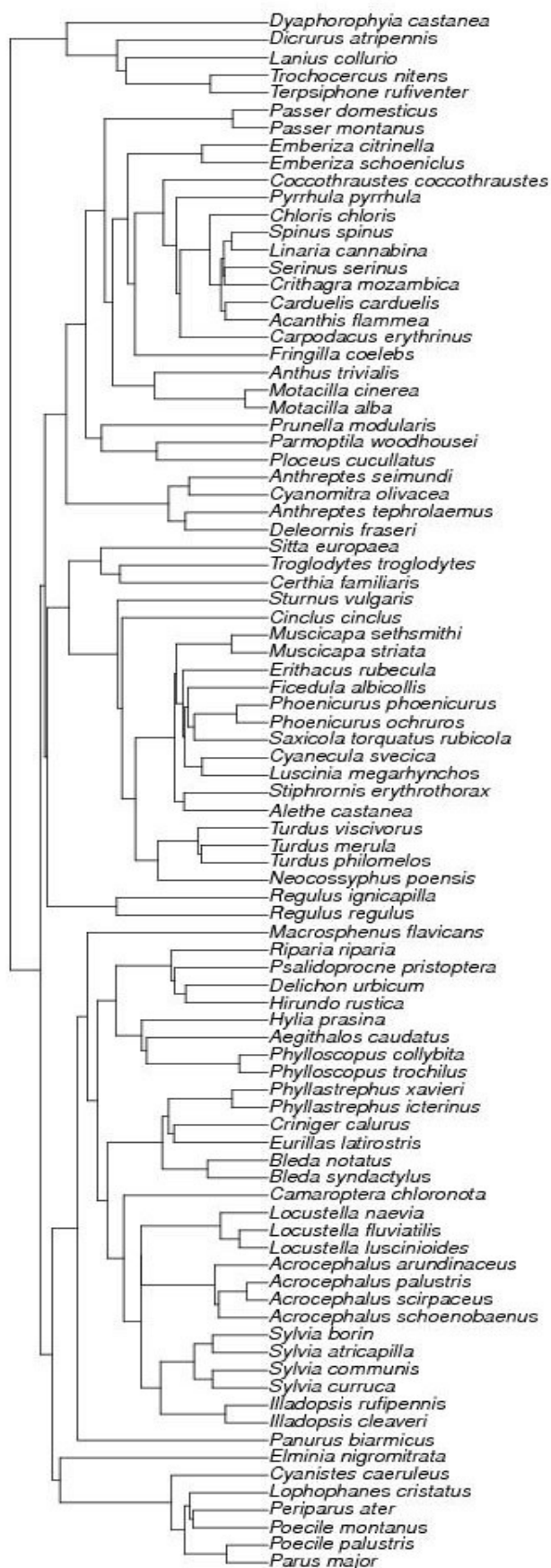
Yeagle, P. (2016). *The membranes of cells* (Academic Press).

12. PŘÍLOHY

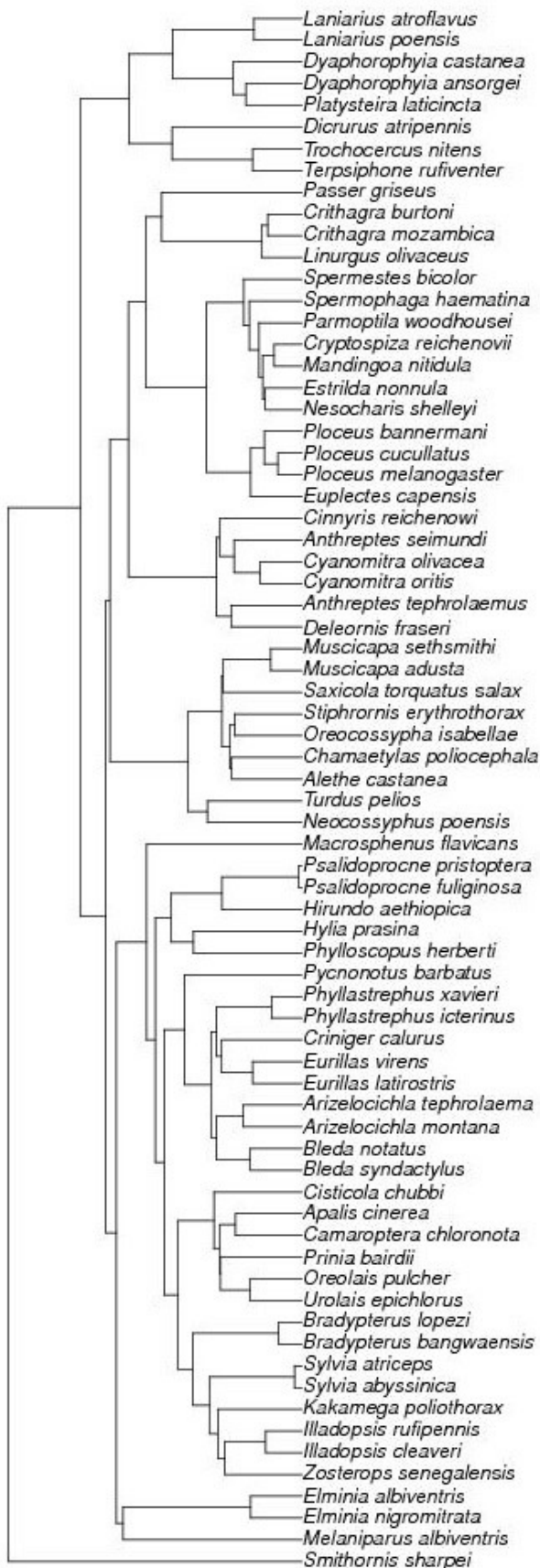
TEMPERÁTNÍ DRUHY	TROPICKÉ DRUHY
Acanthis flammea	Alethe castanea
Acrocephalus arundinaceus	Anthreptes seimundi
Acrocephalus palustris	Anthreptes tephrolaemus
Acrocephalus scirpaceus	Apalis cinerea
Acrocephalus schoenobaenus	Arizelocichla montana
Aegithalos caudatus	Arizelocichla tephrolaema
Anthus trivialis	Bleda notatus
Carduelis carduelis	Bleda syndactylus
Carpodacus erythrinus	Bradypterus bangwaensis
Certhia familiaris	Bradypterus lopezi
Cinclus cinclus	Camaroptera chloronota
Coccothraustes coccothraustes	Cinnyris reichenowi
Cyanecula svecica	Cisticola chubbi discolor
Cyanistes caeruleus	Criniger calurus
Delichon urbicum	Crithagra burtoni
Emberiza citrinella	Crithagra mozambica
Emberiza schoeniclus	Cryptospiza reichenovii
Erithacus rubecula	Cyanomitra olivacea
Ficedula albicollis	Cyanomitra oritis
Fringilla coelebs	Deleornis fraseri
Hirundo rustica	Dicrurus atripennis
Chloris chloris	Dyaphorophya ansorgei
Lanius collurio	Dyaphorophya castanea
Linaria cannabina	Elminia albiventris
Locustella fluviatilis	Elminia nigromitrata
Locustella luscinioides	Estrilda nonnula
Locustella naevia	Euplectes capensis
Lophophanes cristatus	Eurillas latirostris
Luscinia megarhynchos	Eurillas virens
Motacilla alba	Hirundo aethiopica
Motacilla cinerea	Hylia prasina
Muscicapa striata	Chamaetylas poliocephala
Panurus biarmicus	Illadopsis cleaveri
Parus major	Illadopsis rufipennis
Passer domesticus	Kakamega poliothorax
Passer montanus	Laniarius atroflavus
Periparus ater	Laniarius poensis
Phoenicurus ochruros	Linurgus olivaceus

Phoenicurus phoenicurus	Macrosphenus flavicans
Phylloscopus collybita	Mandingoa nitidula
Phylloscopus trochilus	Melaniparus albiventris
Poecile montanus	Muscicapa adusta
Poecile palustris	Muscicapa sethsmithi
Prunella modularis	Neocossyphus poensis
Pyrrhula pyrrhula	Nesocharis shelleyi
Regulus ignicapilla	Oreocossypha isabellae
Regulus regulus	Oreolais pulcher
Riparia riparia	Parmoptila woodhousei
Saxicola torquatus rubicola	Passer griseus
Serinus serinus	Phyllastrephus icterinus
Sitta europaea	Phyllastrephus xavieri
Spinus spinus	Phylloscopus herberti
Sturnus vulgaris	Platysteira laticincta
Sylvia atricapilla	Ploceus bannermani
Sylvia borin	Ploceus cucullatus
Sylvia communis	Ploceus melanogaster
Sylvia curruca	Prinia bairdii
Troglodytes troglodytes	Psolidoprocne fuliginosa
Turdus merula	Psolidoprocne pristoptera
Turdus philomelos	Pycnonotus barbatus
Turdus viscivorus	Saxicola torquatus salax
	Smithornis sharpei
	Spermestes bicolor
	Spermophaga haematina
	Stiphrornis erythrothorax
	Sylvia abyssinica
	Sylvia atriceps
	Terpsiphone rufiventer
	Trochocercus nitens
	Turdus pelios
	Urolais epichlorus
	Zosterops senegalensis

Tabulka S1. Temperátní a tropické druhy pěvců použité pro analýzy. Tučně zvýrazněné jsou druhy, které byly použity pro analýzu latitudinálních rozdílů. Pro analýzu elevačních rozdílů byly použity všechny tropické druhy v této tabulce.

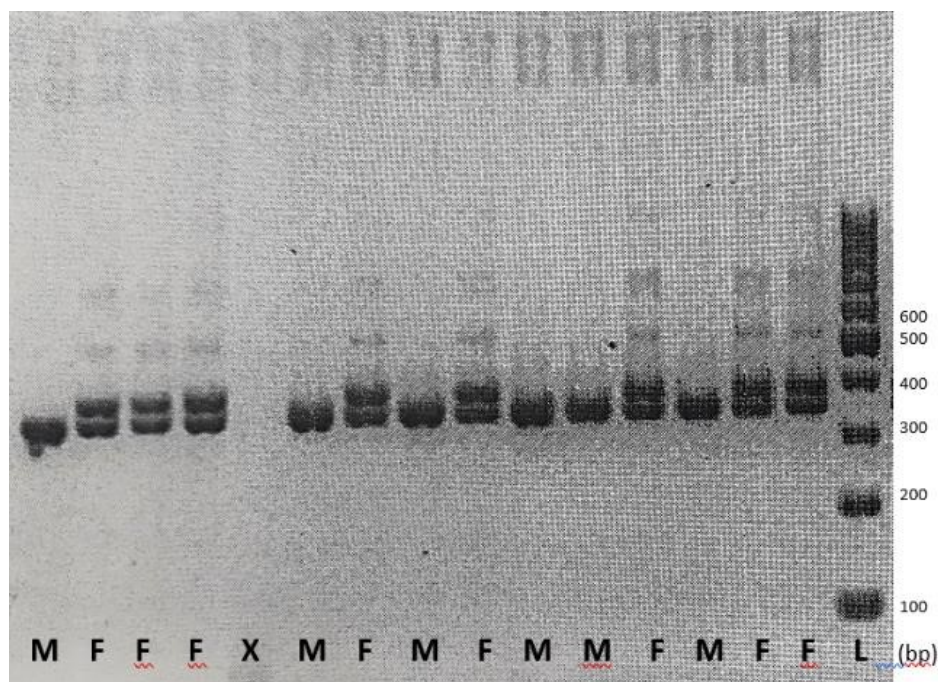


Obr. S1. **Fylogenetický strom temperátních a tropických nížinných ptačích druhů použitých pro analýzy latitudinálních rozdílů.** Informace o fylogenetické příbuznosti převzaty z birdtree.com.

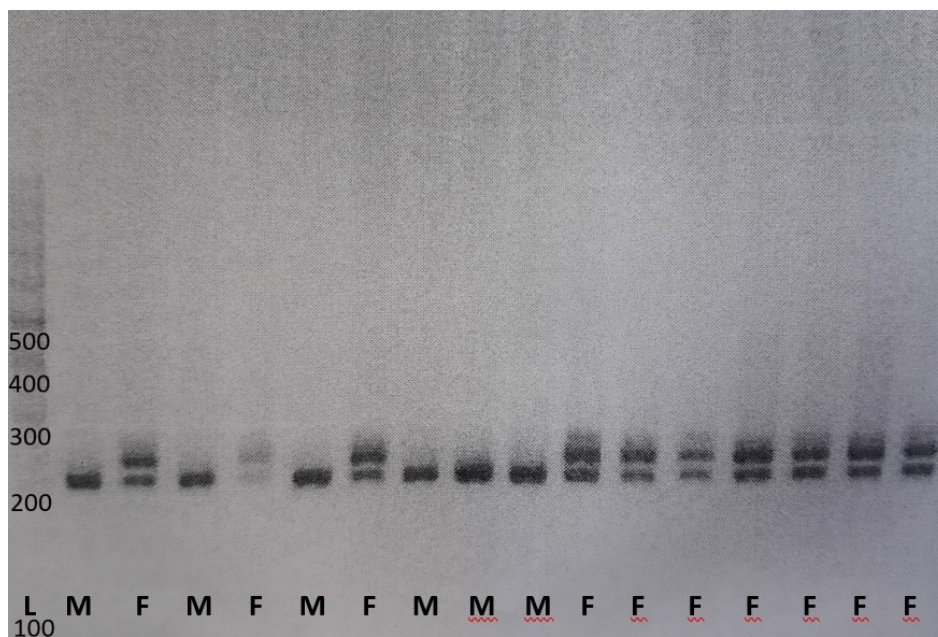


Obr. S2. Fylogenetický strom tropických druhů pěvců použitých pro analýzy elevačních rozdílů.

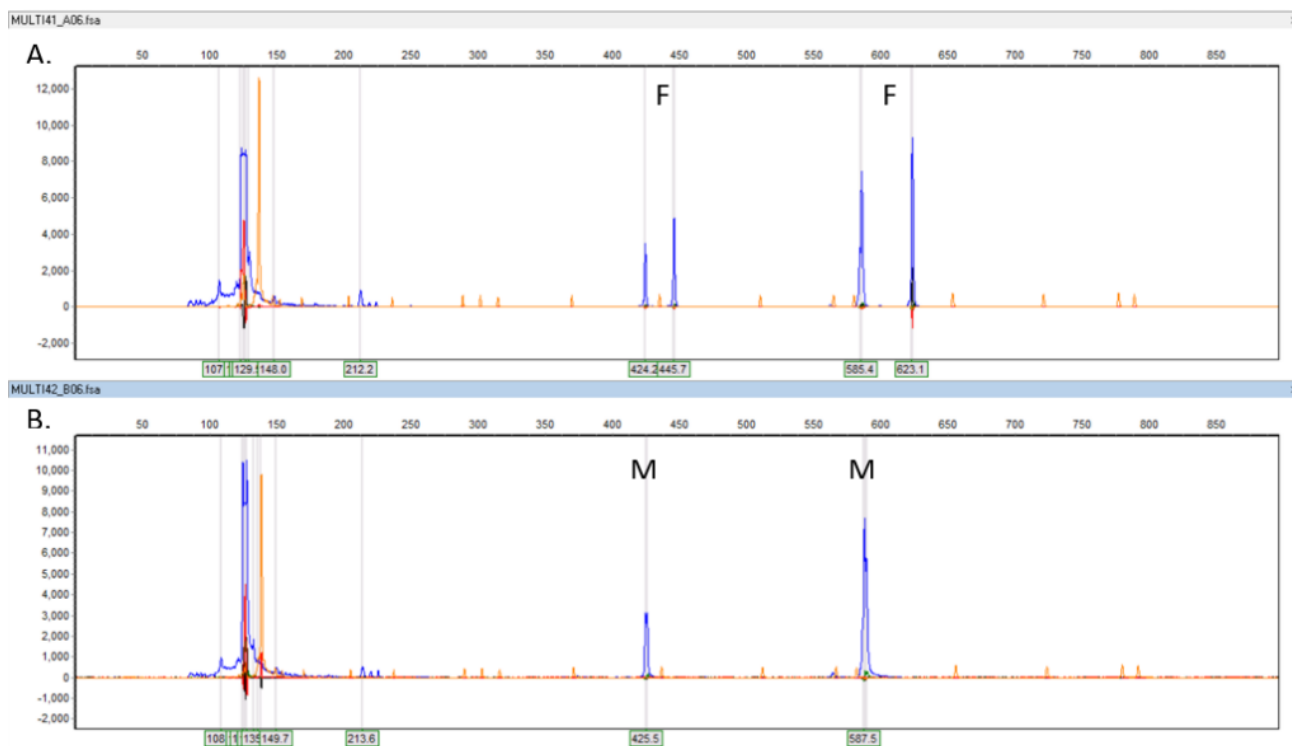
Informace o fylogenetické příbuznosti převzaty z birdtree.com.



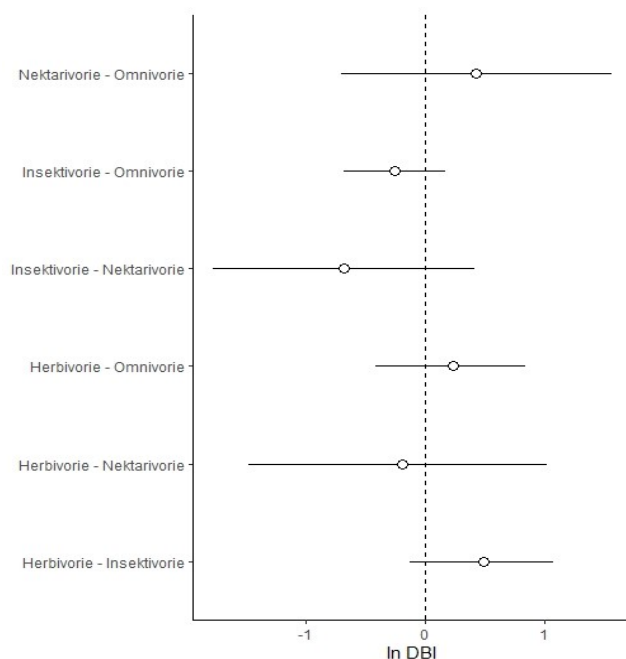
Obr. S3. Výsledky určování pohlaví pomocí genu CHD1 a primerů P2,P8 u *Cyanomitra oritis*. L = DNA ladder (velikostní marker, hmotnostní standart), F - značí samici se 2 viditelnými proužky (CHD1-W, CHD1-Z), M - značí samce s viditelným pouze 1 proužkem (CHD1-Z), X – nefungující vzorek.



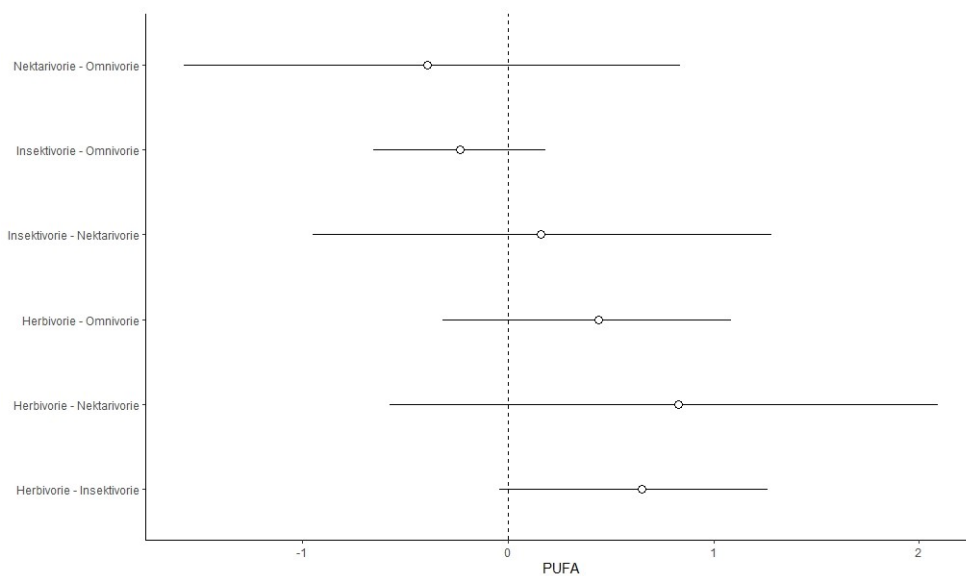
Obr. S4. Výsledky určování pohlaví pomocí genu ATP5A1, primery F2, R1 u jedinců rodu *Andropadus* (*virens*, *tephrolaemus*, *latirostris*, *montanus*). L = DNA ladder (velikostní marker, hmotnostní standart), F - značí samici se 2 viditelnými proužky (ATP5A1-W, ATP5A1-Z), M - značí samce s viditelným pouze 1 proužkem (ATP5A1-Z).



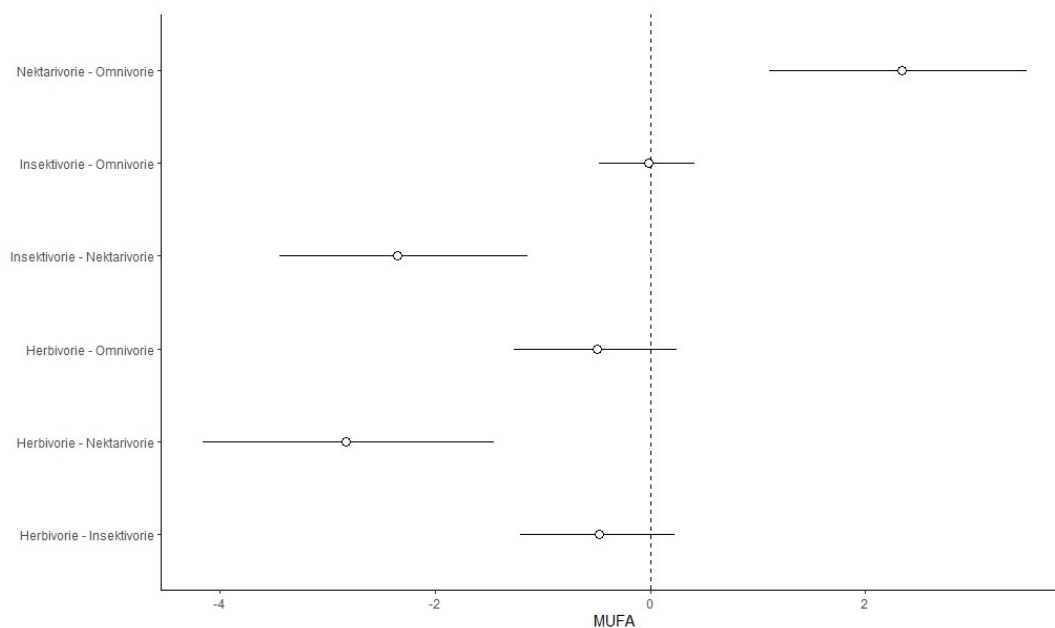
Obr. S5. Vyhodnocení výsledků z fragmentační analýzy. A. Výsledky zobrazující 2 viditelné píky (vrcholy) značící samici (F) *Cyanomitra olivacea* za pomoci genů ATP5A1 (vlevo) a CHD1 (vpravo). **B.** Výsledky zobrazující 1 pík (vrchol) u samce (M) *Cyanomitra olivacea* opět za pomoci genů ATP5A1 (vlevo) a CHD1 (vpravo).



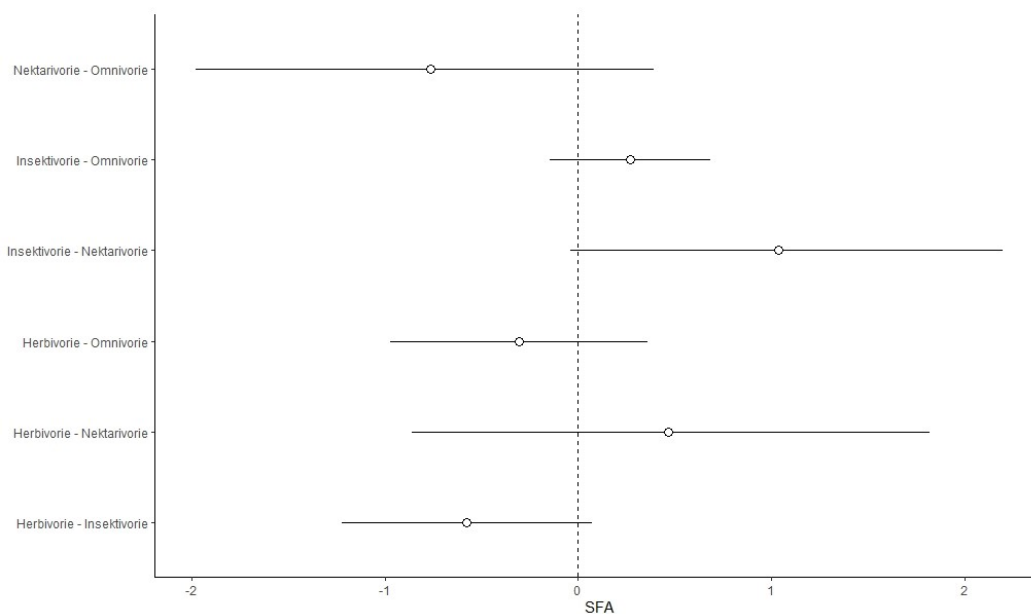
Graf S1. Vliv potravních strategií na počet dvojných vazeb ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



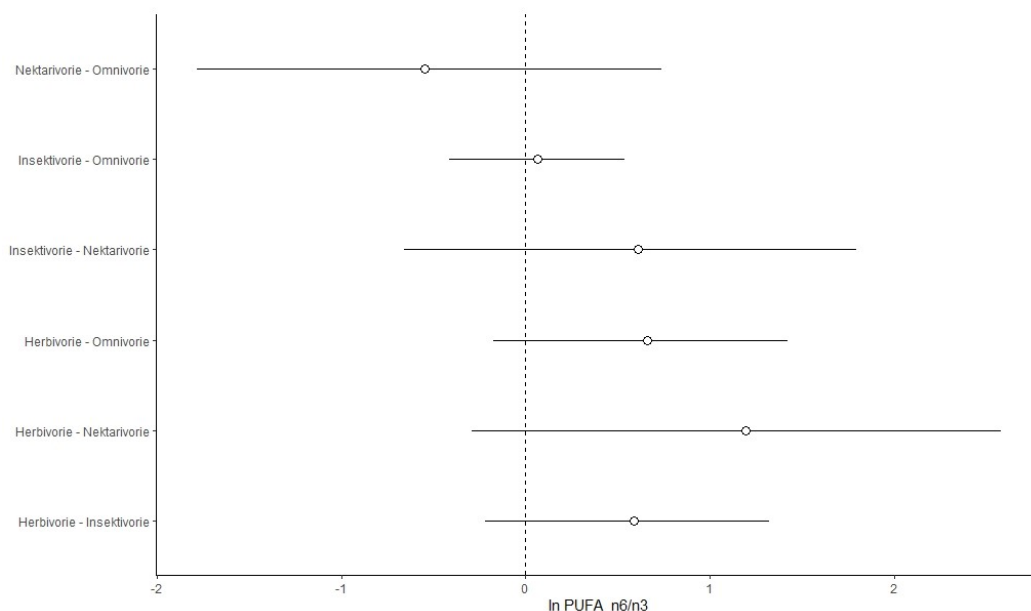
Graf S2. Vliv potravních strategií na obsah PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



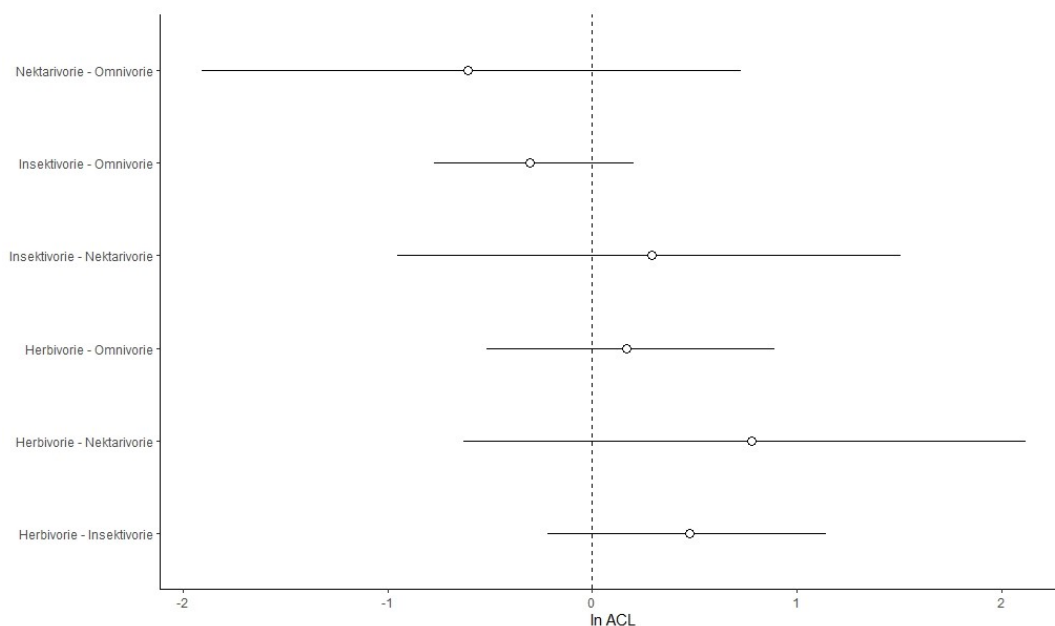
Graf S3. Vliv potravních strategií na obsah MUFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



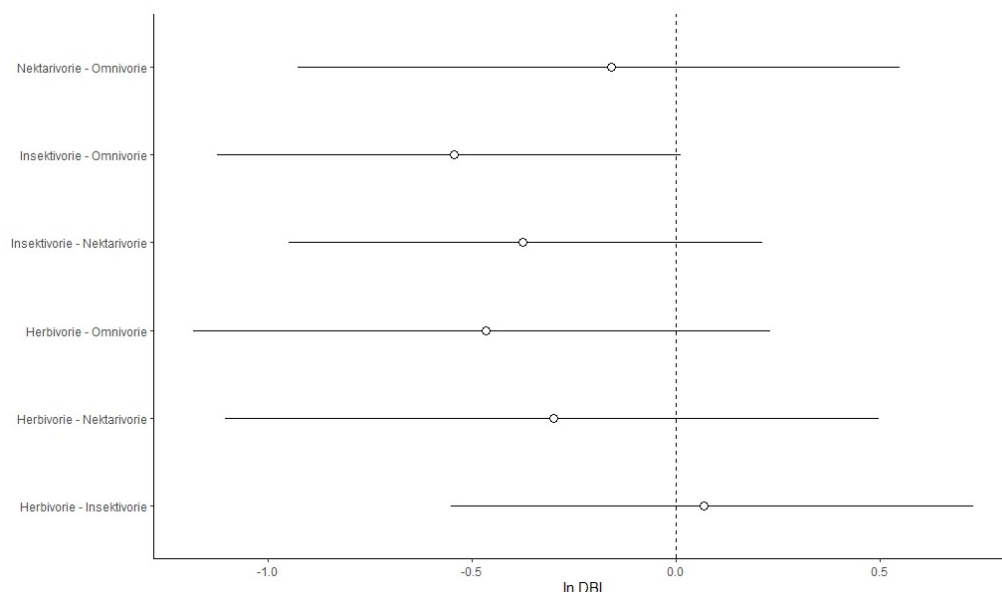
Graf S4. Vliv potravních strategií na obsah SFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



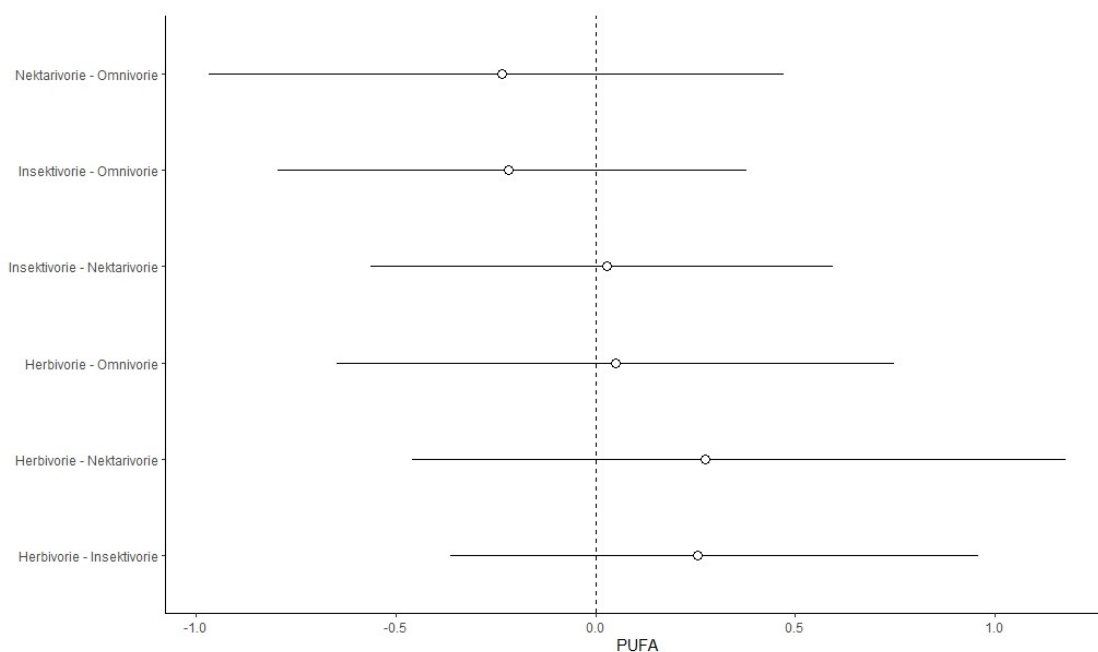
Graf S5. Vliv potravních strategií na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



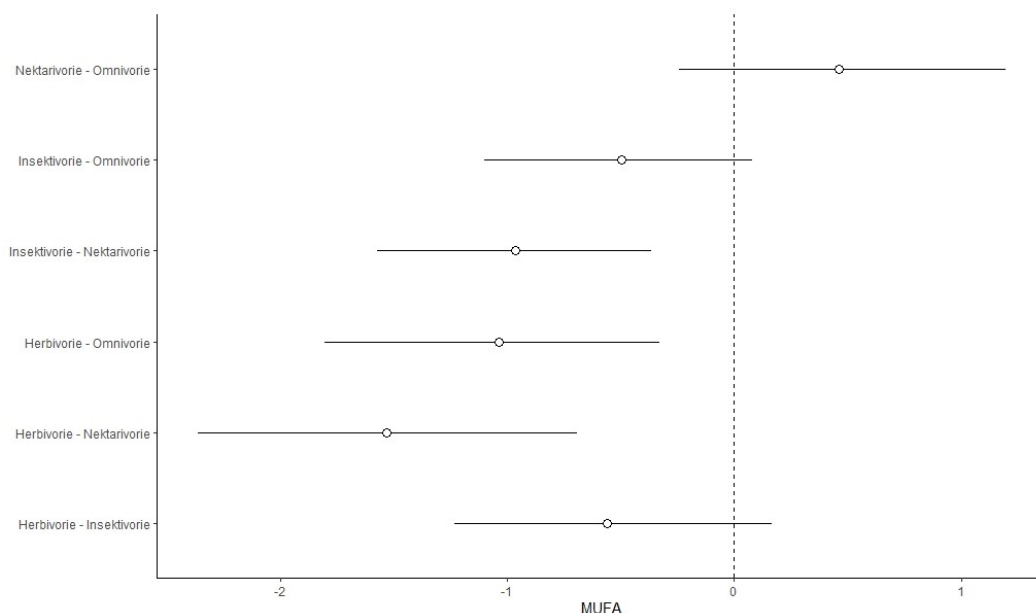
Graf S6. Vliv potravních strategií na délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek u nížinných tropických a temperátních druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 188$, $N_{\text{druhů}} = 57$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 52$, $N_{\text{druhů}} = 15$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 6$, $N_{\text{druhů}} = 2$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 45$, $N_{\text{druhů}} = 13$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



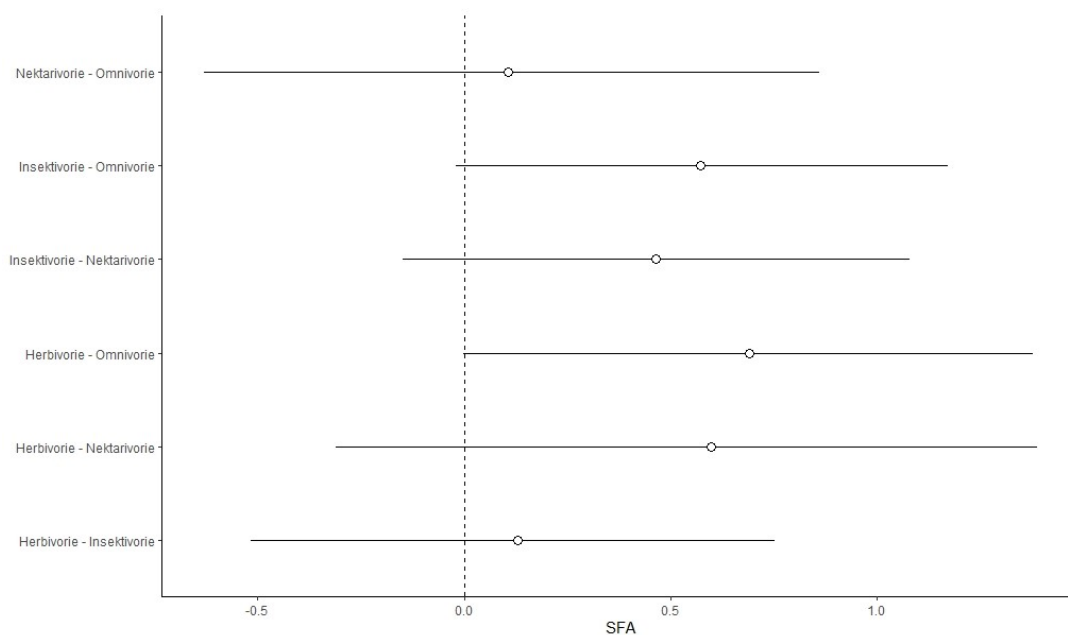
Graf S7. Vliv potravních strategií na počet dvojných vazeb ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{jedinců} = 159$, $N_{druhů} = 47$; Omnivorie - $N_{jedinců} = 30$, $N_{druhů} = 9$; Nektarivorie - $N_{jedinců} = 25$, $N_{druhů} = 9$; Herbivorie - $N_{jedinců} = 30$, $N_{druhů} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



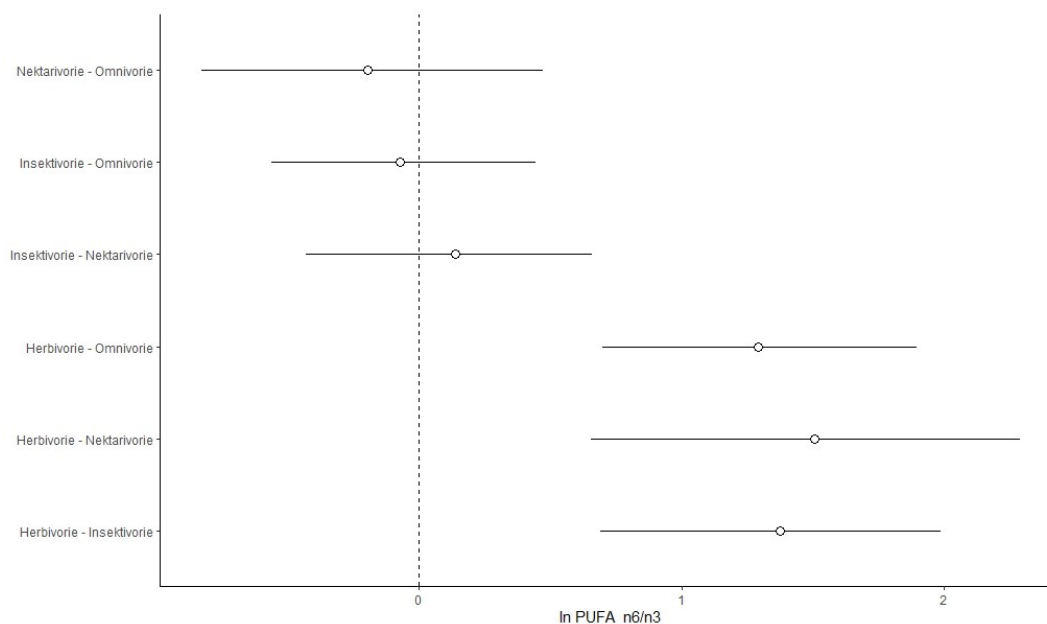
Graf S8. Vliv potravních strategií na obsah PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{jedinců} = 159$, $N_{druhů} = 47$; Omnivorie - $N_{jedinců} = 30$, $N_{druhů} = 9$; Nektarivorie - $N_{jedinců} = 25$, $N_{druhů} = 9$; Herbivorie - $N_{jedinců} = 30$, $N_{druhů} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



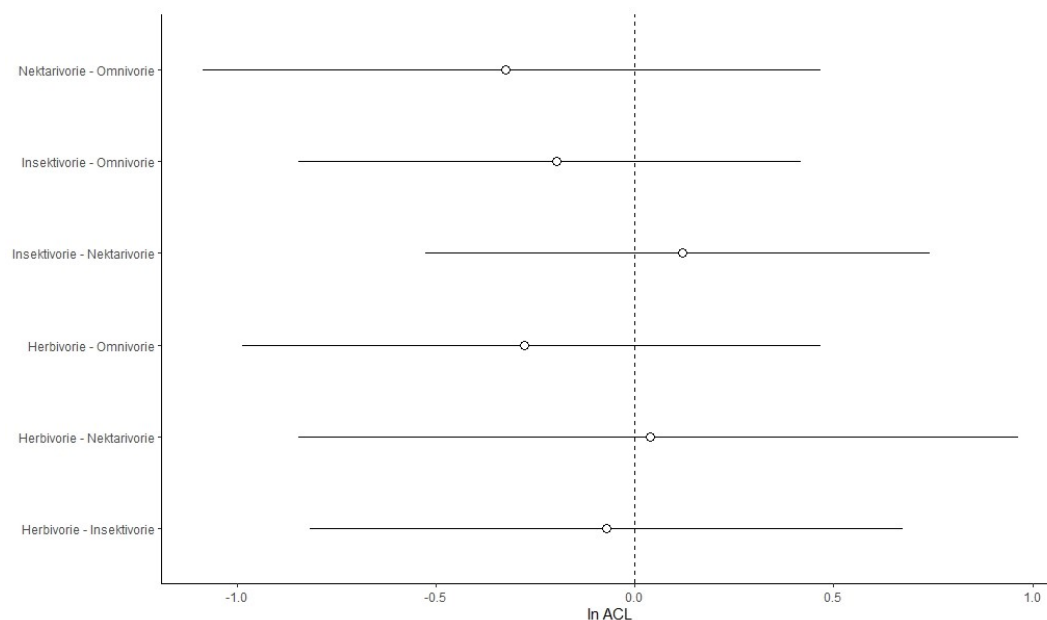
Graf S9. Vliv potravních strategií na obsah MUFA ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 159$, $N_{\text{druhů}} = 47$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 25$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



Graf S10. Vliv potravních strategií na obsah SFA ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 159$, $N_{\text{druhů}} = 47$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 25$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



Graf S11. Vliv potravních strategií na poměr n6/n3 PUFA ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 159$, $N_{\text{druhů}} = 47$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 25$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.



Graf S12. Vliv potravních strategií na průměrnou délku řetězce MK ve fosfolipidech červených krvinek u tropických druhů ptáků. Insektivorie - $N_{\text{jedinců}} = 159$, $N_{\text{druhů}} = 47$; Omnivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Nektarivorie - $N_{\text{jedinců}} = 25$, $N_{\text{druhů}} = 9$; Herbivorie - $N_{\text{jedinců}} = 30$, $N_{\text{druhů}} = 9$. Znázorněny jsou odhady průměrných rozdílů a jejich 95% intervaly kredibility.